

Université de Montréal

**Cartographie dynamique des voies de signalisation MAPK chez la levure
*Saccharomyces cerevisiae***

**Par
Philippe Nissaire**

**Département de biochimie
Faculté de médecine**

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès science (M.Sc.)
en biochimie**

Décembre 2005

© Philippe Nissaire, 2005



W

4

U58

200p

V.0.61

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Cartographie dynamique des voies de signalisation MAPK chez la levure
Saccharomyces cerevisiae

présenté par :

Philippe Nissaire

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Nikolaus Heveker **président-rapporteur**

Dr. Stephen Michnick **directeur de recherche**

Dr. Hervé Philippe **membre du jury**

Mémoire accepté le : 20 mars 2006



Résumé

La biologie des systèmes vise à intégrer nos connaissances au niveau du fonctionnement des composantes de la cellule. Des outils permettant d'observer le comportement dynamique de ces composantes doivent être développés, puisqu'il existe un manque important d'informations sur leur comportement dynamique. L'étude des interactions entre les composantes protéiques des complexes fonctionnels, qui sont à la base de la majorité des fonctions de la cellule, est fondamentale à cette fin. Le « Fluorescent Protein-fragment complementation assay », ou PCA par fluorescence, est une méthode développée par notre laboratoire et permettant de détecter *in vivo* les interactions protéine-protéine. Nous souhaitons établir les capacités du PCA par fluorescence à cartographier des voies de signalisation, autant à l'état statique qu'en présence de stimulation. Nous avons choisi la voie MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) HOG de *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle simple et facile d'utilisation pour effectuer nos essais. La cartographie statique par PCA de la voie HOG a permis de détecter la majorité des interactions rapportées dans la littérature, et a aussi permis de détecter de nouvelles interactions potentielles. Par contre, le PCA par fluorescence s'est révélé être incapable de détecter les modulations rapides survenant lors de l'activation de la voie HOG. La quête d'une approche PCA permettant d'observer, en temps réel, les changements survenant au niveau des complexes de protéines est donc toujours en cours. Une telle approche fournirait un outil important nous permettant de mieux comprendre les mécanismes complexes qui sont à la base de la vie.

Mots clefs: Interactions protéine-protéine, « Protein-fragment complementation assay » (PCA), voie de réponse au choc osmotique

Abstract

Systems Biology aims at integrating various aspects of cellular functions to increase our knowledge about them. Tools allowing the dynamic study of the various components of the cell need to be developed, since data concerning the dynamic behavior of the cell are lacking. The study of interactions occurring between proteins involved in functional complexes, which are known to be central to most cellular functions, is fundamental in achieving this goal. The Fluorescent Protein-fragment Complementation Assay, a method developed in our lab, allows facile detection of protein interactions *in vivo*. Our aim was to establish the capabilities of this assay at detecting protein-protein interactions in signaling pathways, both at the steady state and the dynamic state. We chose the HOG MAPK pathway of yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a simple and easy to use model to test this hypothesis. Fluorescent PCA mapping of the HOG pathway allowed us to detect most known interactions as well as some new potential interactions. However, our approach was unable to detect the rapid modulations that occur when the HOG pathway is activated. The quest for a PCA approach that would allow us to follow the dynamics of protein interactions in real time is still ongoing. Such an approach would provide scientists with an important tool allowing a better understanding of the mechanisms which allow a cell to live.

Key words: protein-protein interactions, Protein-fragment complementation assay (PCA), high osmolarity pathway

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abbreviations.....	x
Introduction	1
La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en tant que modèle pour l'étude du choc osmotique.....	2
Les voies de signalisation MAPK	4
Les MAPK chez <i>S. cerevisiae</i>	6
La voie HOG	6
Senseurs de la voie HOG	10
Activation de la branche Sho1	12
Activation de la branche Sln1	13
Implication des phosphatases	13
Localisation des composantes de la voie HOG.....	15
Deux voies non redondantes	17
Conséquences de l'activation de la voie HOG.....	18
Voies MAPK et spécificité du signal.....	20
Études statiques et dynamiques.....	22
Méthodes de détection d'interactions protéine-protéine.....	22
Le PCA par fluorescence.....	26
Le PCA par fluorescence appliqué à la cartographie des voies de signalisation.....	28
Matériel et méthodes	34
Souches bactériennes, souches de levure et conditions de culture.....	35
Constructions génétiques	36
Amplification des fragments 1 et 2 et des versions pleines longueur de la yEGFP, la Citrine, la mCitrine et la Venus	36
Sous clonage de yEGFP, Citrine, mCitrine et Venus dans les vecteurs d'expression p413ADH et p415ADH en vue de l'essai de comparaison	38
Mutagénèse dirigée sur la Venus.....	38

Mutagenèse dirigée sur la Venus	38
Sous-clonage de la mCitrine et ses fragments dans les vecteurs d'expression p413ADH et p415ADH en vue de la cartographie	41
Extraction et amplification des ORFs de la voie HOG à partir du génome de la levure	42
Sous-clonage des ORFs de la voie HOG dans les vecteurs d'expression p413ADH et p415ADH contenant la mCitrine ou ses fragments	42
Transformations dans les levures et accouplement.....	44
Mesures de fluorescence.....	44
Essais PCA par microscopie	46
Quantification des images de microscopie	46
Essais PCA par FACS	47
Cartographie statique sur lecteur de plaques.....	47
Observations de la dynamique de localisation par microscopie.....	47
Cartographie dynamique sur lecteur de plaques	48
Résultats	49
Choix d'un système d'expression	50
Choix du rapporteur.....	51
Cartographie statique de la voie HOG	54
Observation dynamique de localisation	60
Cartographie dynamique	61
Discussion	67
Choix du système expérimental.....	68
Cartographie statique.....	72
Dynamique de localisation des protéines.....	77
Cartographie dynamique	79
Bibliographie.....	85

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de la structure habituelle des voies MAPK.....	5
Figure 2 : Schéma des six voies MAPK de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
Figure 3 : Structure détaillée de la voie HOG.....	8
Figure 4 : Localisation subcellulaire des composantes de la voie HOG avant et après un choc osmotique.....	16
Figure 5 : Principes généraux du PCA.....	25
Figure 6 : Principes du PCA par fluorescence chez la levure basé sur l'expression à partir de plasmides.....	30
Figure 7 : Principes du PCA par fluorescence chez la levure basé sur la recombinaison homologue et l'expression sous contrôle du promoteur endogène...	31
Figure 8 : Constructions génétiques nécessaires à l'essai de comparaison pour le choix du rapporteur.....	39
Figure 9 : Constructions génétiques nécessaires aux essais de cartographie.....	45
Figure 10 : Comparaison du signal de fluorescence des différentes variantes de la GFP et la YFP (pleine longueur et PCA) fusionnées du côté C-terminal des protéines d'intérêt et exprimées à partir des vecteurs d'expression p413ADH et p415ADH, tel que mesuré par FACS et par microscopie.....	52
Figure 11 : Souches de levures transformées avec des vecteurs exprimant diverses constructions.....	53
Figure 12 : Comparaison entre le signal PCA de différentes variantes de protéines fluorescentes dont les fragments 1 et 2 sont fusionnés respectivement à Ras et au RBD de Raf et exprimés à partir des vecteurs p413ADH et p415ADH, tel que mesuré par FACS.....	55
Figure 13 : Cartographie statique des composantes sous-clonées de la voie HOG sur lecteur de plaques.....	57
Figure 14 : Représentation graphique des résultats présentés à la figure 10.....	58
Figure 15 : Comparaison entre les interactions rapportées par la littérature et celles détectées par PCA pour les composantes de la voie HOG.....	61

Figure 16 : Dynamique de localisation de composantes de la voie HOG fusionnées, au C-terminal, avec la mCitrine pleine longueur.....	62
Figure 17 : Cartographie dynamique des composantes de la voie HOG en réponse au choc osmotique.....	64
Figure 18 : Cartographie dynamique des composantes de la voie HOG en réponse à des chocs osmotiques de concentration variée.....	66

Figure 16 : Dynamique de localisation de composantes de la voie HOG fusionnées, au C-terminal, avec la mCitrine pleine longueur.....	62
Figure 17 : Cartographie dynamique des composantes de la voie HOG en réponse au choc osmotique.....	64
Figure 18 : Cartographie dynamique des composantes de la voie HOG en réponse à des chocs osmotiques de concentration variée.....	66

Liste des tableaux

Tableau I : Liste des oligonucléotides employés lors des amplifications par PCR de la mCitrine.....	37
Tableau II : Liste des oligonucléotides employés lors de la mutagenèse de la Venus en mVenus.....	40
Tableau III : Liste des oligonucléotides employés lors des amplifications par PCR des ORFs de la voie HOG.....	43
Tableau IV: Niveau d'expression des différentes composantes de la voie HOG...	70

Liste des abréviations

ADH: Alcool déshydrogénase

BRET: «Bio-luminescence Resonance Energy Transfer», ou transfert d'énergie de bio-luminescence par résonance

DHFR: Dihydrofolate réductase

DSP: «Dual-Specificity Phosphatase», ou phosphatase à double spécificité

F1 : Fragment 1

F2 : Fragment 2

FACS: «Fluorescence-Activated Cell Sorting», ou tri de cellules activé par fluorescence

FRET: «Fluorescence Resonance Energy Transfer», ou transfert d'énergie de fluorescence par résonance

GFP: «Green Fluorescent Protein», ou protéine fluorescente verte

HOG: «High Osmolarity Glycerol», ou glycérol haute osmolarité

MAPK : «Mitogen-Activated Protein Kinase », ou kinase de protéines activée par les mitogènes

MAPKK : «Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase» ou kinase de kinase de protéines activée par les mitogènes

MAPKKK : «Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase» ou kinase de kinase de kinase de protéines activée par les mitogènes

ORF: «Open Reading Frame», ou cadre ouvert de lecture

PCA: «Protein-fragment Complementation Assay», ou essai de complémentarité de fragments protéiques

PCR: «Polymerase Chain Reaction», ou réaction de polymérisation en chaîne

PL : Pleine longueur

PP2C: «Protein Phosphatase-type 2C», ou phosphatase de protéine de type 2C

PTP: «Protein Tyrosine Phosphatase», ou tyrosine-phosphatase de protéines

RBD: «Ras-Binding Domain», ou domaine de liaison à Ras

RFP: «Red Fluorescent Protein», ou protéine fluorescente rouge

SH3: «Src-Homology 3»

TAP-TAG: «Tandem Affinity Purification-TAG», ou marqueur de purification en tandem

yEGFP: «yeast codon-optimized Enhanced Green Fluorescent Protein», ou protéine fluorescente verte améliorée avec des codons optimisés pour la levure

YFP: «Yellow Fluorescent Protein», ou protéine fluorescente jaune

Introduction

Généralités

La science, en tant que connaissance, a toujours cherché à conceptualiser et à modéliser la réalité de ce monde, et ce, afin de nous aider à mieux le comprendre. Cette tendance est d'autant plus forte lorsqu'on étudie le monde très abstrait et microscopique de la cellule. Le séquençage du génome des organismes vivants nous a apporté la génomique. L'étude du protéome de ces organismes nous a menés à la protéomique. À la richesse des données provenant de ces recherches s'oppose notre incapacité à toutes les intégrer et les conceptualiser. La biologie des systèmes est une discipline naissante qui vise justement à intégrer, et ultimement modéliser, toutes ces connaissances. Elle répond à ce besoin pressant de conceptualiser les organismes vivants et leurs composantes, qui sont intrinsèquement reliées, chacune exerçant sa fonction afin de donner lieu à la vie. La présente recherche s'inscrit dans cette perspective.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* en tant que modèle pour l'étude du choc osmotique

Dans le but de simplifier ce travail colossal, nous nous sommes dotés d'organismes modèles qui, malgré leur simplicité et leur facilité d'usage, sont un reflet des organismes plus complexes. La levure *Saccharomyces cerevisiae* est aujourd'hui le modèle Eucaryote le mieux caractérisé, en grande partie puisque son génome est le premier génome d'Eucaryote ayant été séquencé (Goffeau *et al.* 1996). Ce saprophyte unicellulaire hétérotrophique vit normalement sur les fruits et les animaux, où il catabolise préférentiellement les sucres comme source de carbone. Au cours de son évolution, la levure a dû continuellement s'adapter aux changements de son environnement, puisqu'elle n'a pas d'éléments moteurs lui permettant d'échapper à celui-ci. Dans son milieu naturel, elle a été exposée à des conditions variables de disponibilité de nutriments, de température, de pH, d'oxygénation et d'osmolarité. Les fruits sont effectivement un environnement osmotique capricieux, les levures étant exposées aux sucres de plus en plus

concentrés du fruit mûrissant tout autant qu'à la pluie, qui en comparaison est hypo-osmotique (Smits *et al.* 1999).

Les levures ont donc développé des mécanismes de contrôle de l'osmolarité afin d'adapter leur métabolisme et leur physiologie aux changements du milieu et poursuivre leur prolifération. Comme le changement des propriétés osmotiques du milieu est souvent brusque, et que les échanges de molécules d'eau à travers la membrane sont rapides, la levure a dû développer des mécanismes rapides de réponse. L'adaptation des levures aux chocs osmotiques comporte des mécanismes à court terme et à long terme (Blomberg *et al.* 1992, Mager *et al.* 1993). Les levures peuvent être métaboliquement actives sur une grande gamme d'osmolarité, qui varie d'espèce en espèce. Au-delà de ces limites, les levures sont capables de survivre à la déshydratation presque complète. L'intérêt scientifique envers l'osmo-adaptation des levures provient initialement d'un besoin d'améliorer les capacités de la levure à survivre dans les conditions industrielles, où elle est utilisée pour produire la bière, le vin et le pain, notamment. Ce domaine de recherche a soudainement suscité beaucoup plus d'intérêt de la part de la communauté scientifique lorsqu'en 1993, des chercheurs ont découvert qu'une MAPK était impliquée dans le processus d'osmo-adaptation de la levure (Brewster *et al.* 1993). Les principes de l'osmo-adaptation sont conservés parmi les Eucaryotes, et les levures sont devenues un système modèle pour en étudier les mécanismes. *S. cerevisiae* est le modèle de levure le plus fréquemment utilisé pour étudier l'osmo-adaptation, mais *Schizosaccharomyces pombe* est aussi utilisée pour étudier les mécanismes de signalisation (Hohmann 2002).

L'osmolarité, approximation de l'osmolalité, est le potentiel chimique de l'eau libre en solution, exprimé en terme de moles de solutés par moles de solution (Wood 1999). Afin de maintenir le volume de la cellule nécessaire au bon fonctionnement de ses activités biologiques, l'osmolarité extérieure de la cellule doit être légèrement inférieur à celui à l'intérieur. Cette force osmotique est contrée par la capacité de la membrane plasmique à résister à cette pression, ce qui a pour effet de maintenir la

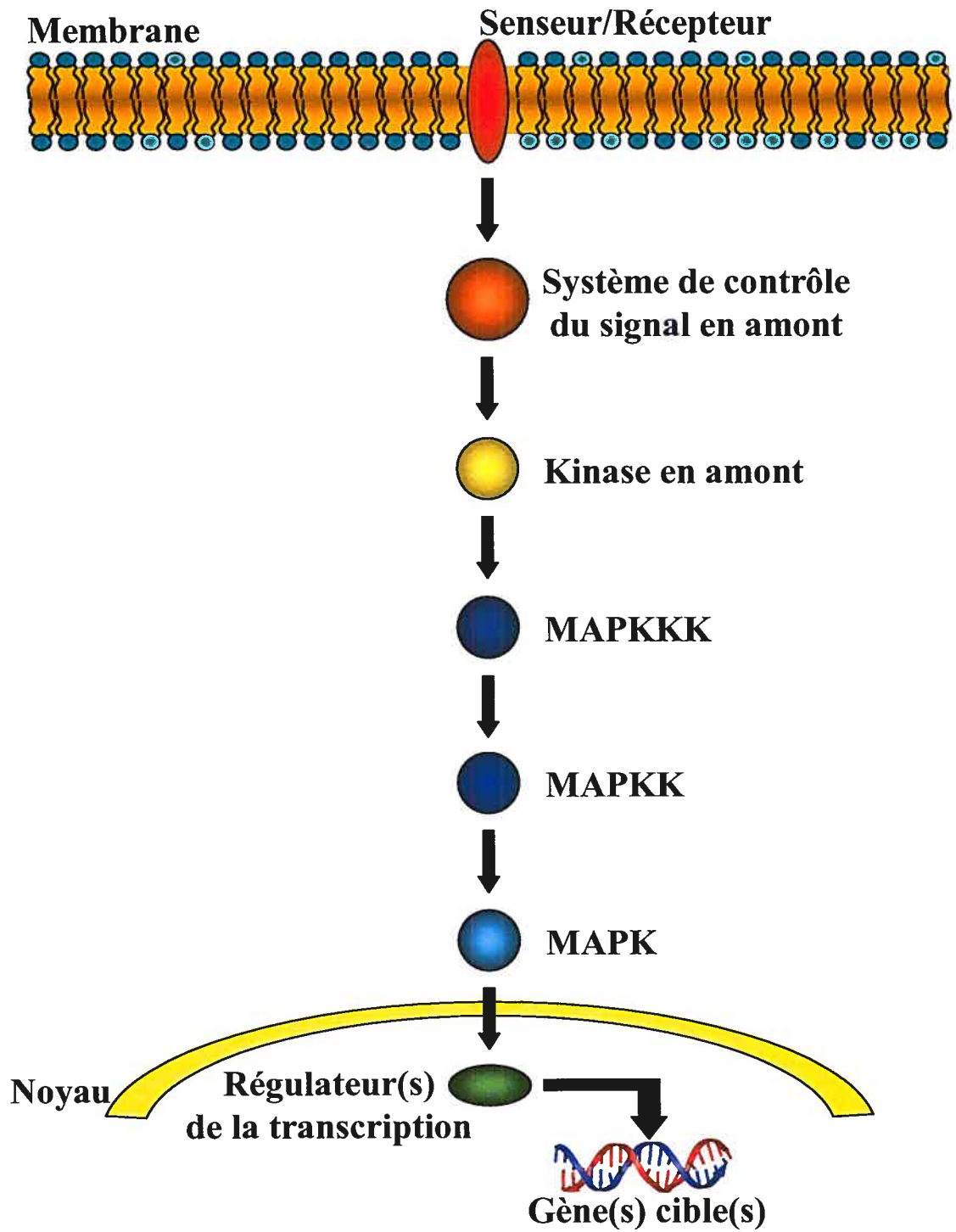
cellule en turgescence (Blomberg *et al.* 1992, Wood 1999). Pour contrecarrer l'effet du choc osmotique, plusieurs organismes vivants activent la synthèse de solutés pouvant rétablir la balance osmotique (glycine, bétaine, sorbitol, sucrose, glycérol, ou encore acides aminés) (Welsh 2000). *S. cerevisiae* répond au choc osmotique en synthétisant du glycérol. Le stress osmotique ne fait pas qu'induire la production de glycérol, mais a un grand impact sur la physiologie cellulaire, causant la réorganisation du cytosquelette, des changements dans les propriétés de la membrane, dans l'homéostasie des ions, dans le métabolisme, ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire, en plus de modifier dramatiquement l'expression des gènes (Hohmann 2002). Les voies MAPK sont à l'origine de ces changements.

Les voies de signalisation MAPK

Les voies des MAPK sont ubiquitaires chez les Eucaryotes, conservées autant chez la levure que chez l'Homme. On les retrouve chez les animaux (Cooper 1994), les plantes (Jonak *et al.* 1999), et les mycètes (Errede *et al.* 1995, Herskowitz 1995). Elles sont habituellement impliquées dans la réponse aux signaux provenant de l'environnement (hormones, facteurs de croissance, cytokines, etc.). Elles contrôlent la croissance cellulaire, la morphogenèse, la prolifération, la réponse au stress, et sont impliquées dans plusieurs maladies. La figure 1 illustre la structure habituelle de ces cascades de signalisation.

Ces voies de signalisation sont activées par un senseur, souvent situé à la membrane. Le senseur stimulé active habituellement un système de relais du signal, qui contrôle l'activation ou l'inhibition de la voie. L'élément ubiquitaire des voies MAPK est le module de protéines MAPKKK (ou MEKK), MAPKK (ou MEK) et MAPK. Une MAPKKK phosphoryle et active la MAPKK sur les résidus sérine et thréonine dans une région conservée du domaine N-terminal. À son tour, la MAPKK activée phosphoryle et active la MAPK sur ses résidus thréonine (parfois sérine) et tyrosine. Cette double phosphorylation est nécessaire à l'activation de la MAPK. Les résidus phosphorylés se trouvent dans la boucle d'activation du

Figure 1 : Schéma de la structure habituelle des voies MAPK (Hohmann 2002). Les voies MAPK sont une cascade de signalisation de protéines transportant le signal de la membrane au noyau, où la MAPK active l'expression de ses gènes cibles. Chaque composante est ici illustrée avec la nomenclature acceptée. Les flèches indiquent la direction du flux d'information.



domaine catalytique de la MAPK. Habituellement, l'activation de la MAPK provoque son transfert vers le noyau, où elle phosphoryle des régulateurs de la transcription, modulant l'expression de ses gènes cibles en réponse aux stimuli. Dans certains cas, des composantes de cette cascade sont partagées par différentes voies de signalisation, comme c'est le cas pour la levure. Une littérature exhaustive et de nombreux articles de revues ont été publiés au sujet des MAPK (Garrington *et al.* 1999, Gustin *et al.* 1998, Schaeffer *et al.* 1999)

Les MAPK chez *S. cerevisiae*

Le séquençage complet du génome de *S. cerevisiae* a permis d'identifier, par similarité de séquence, les MAPK de cet organisme, qui sont au nombre de 5 (Gustin *et al.* 1998). Des études génétiques ainsi que des observations physiologiques ont permis d'établir que ces MAPK sont impliquées dans au moins 6 voies MAPK (Figure 2) (Elion 2000, Hohmann 2002, Posas *et al.* 1998). Ces voies ont pour fonction de diriger la croissance cellulaire (formation des bourgeons, projections lors de l'accouplement, croissance pseudohyphale), de remodeler la surface cellulaire en vue de la croissance (intégrité de la membrane, intégrité de la cellule), et de maintenir la turgescence. La formation de spores est aussi accompagnée d'un remodelage de la surface. En somme, elles sont responsables de la morphogenèse de la cellule en fonction des stimuli de développement et des stimuli externes, la coordonnant avec la prolifération cellulaire.

La voie HOG

La voie MAPK la mieux caractérisée est la voie HOG, qui est activée moins d'une minute après un soudain changement d'osmolarité. Elle est encore aujourd'hui la voie de réponse au stress osmotique la plus connue chez les Eucaryotes. L'organisation de cette voie a été élucidée par une série d'études génétiques et d'épistasie (Figure 3). En 1993, les travaux de Michael Gustin et de ses collègues ont permis de trouver Hog1p et Pbs2p dans un criblage pour des mutants sensibles

Figure 2 : Schéma des six voies MAPK de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Hohmann 2002). Dans l'ordre, elles sont : la voie de réponse aux phéromones, la voie de développement pseudohyphale, la voie de croissance végétative, la voie HOG, la voie de réponse à la perte d'intégrité de la membrane (ou voie PKC) et la voie de sporulation. Les senseurs/récepteurs présumés sont en rouge, les systèmes de contrôle du signal en amont en orange, les kinases en amont en jaune, la cascade de kinase en degrés de bleu, les régulateurs de transcription en vert, et Ste5p, la protéine échafaud de la voie de réponse aux phéromones, est en gris. Les flèches indiquent la direction du flux d'information. Les protéines qui ne sont pas identifiées sont les mêmes que les protéines à leur gauche.

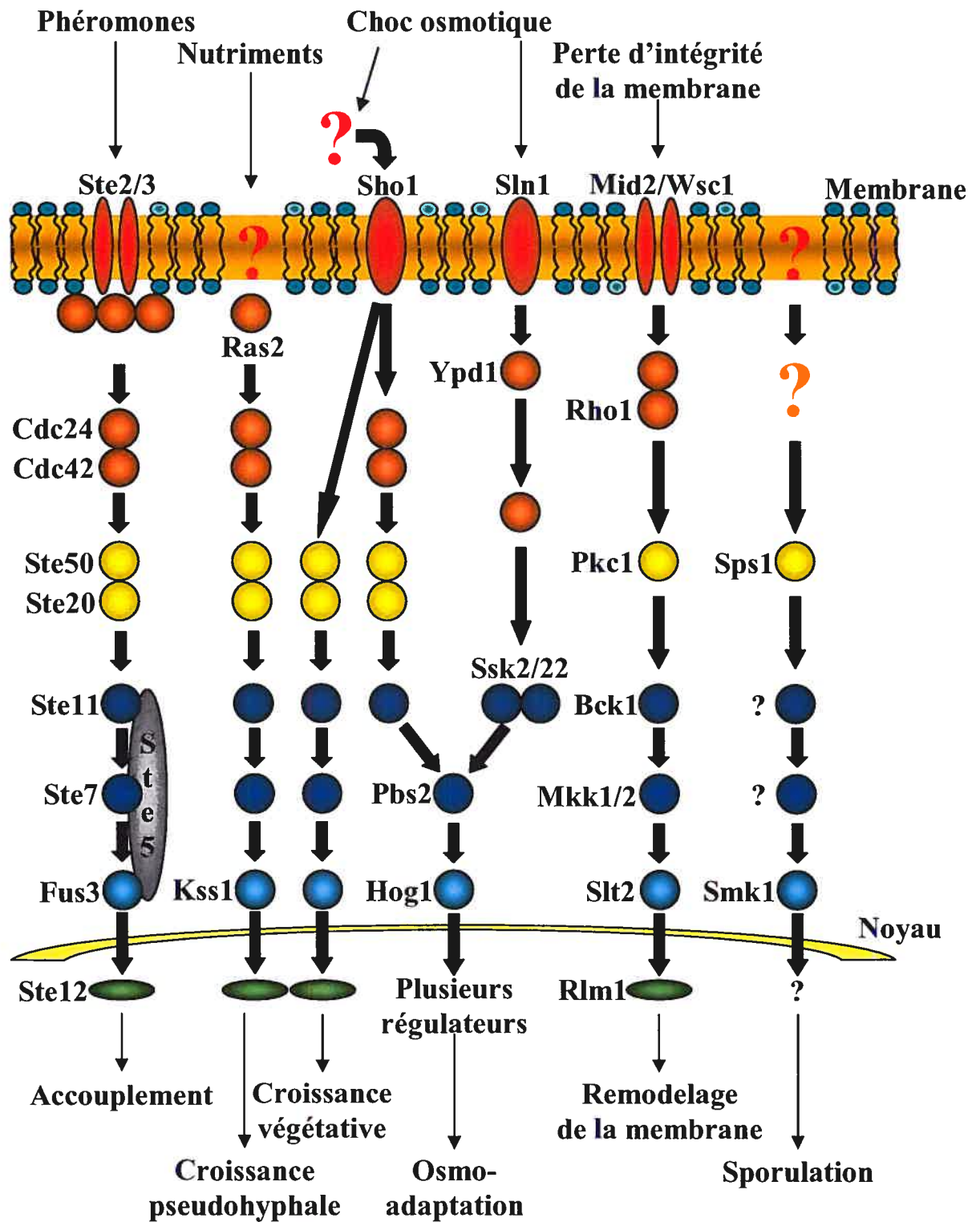
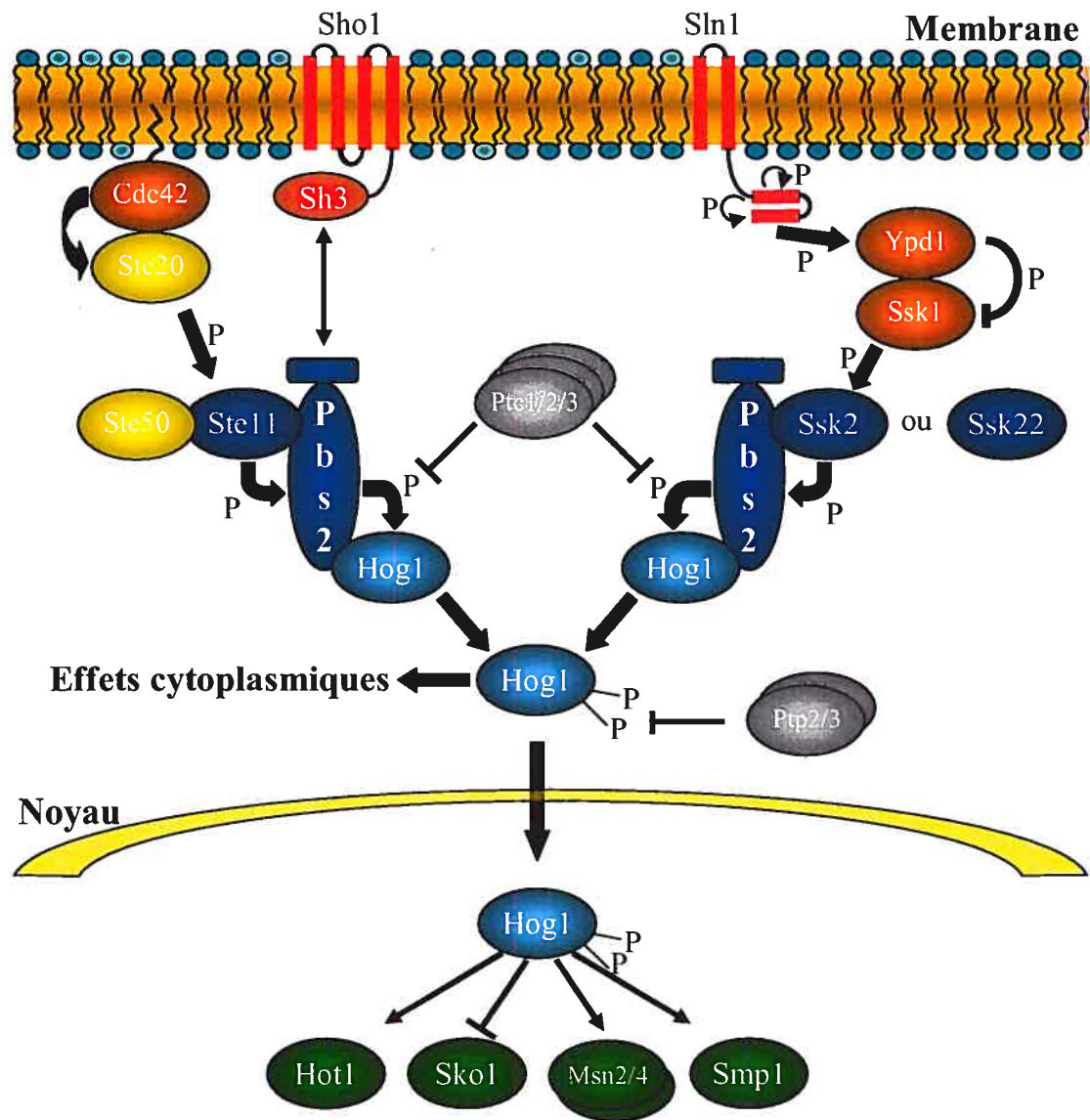


Figure 3 : Structure détaillée de la voie HOG (Hohmann 2002, Seet *et al.* 2004). Les branches Sho1 et Sln1 sont présentées, ainsi que la cascade du signal de l'osmosenseur aux récepteurs nucléaires. Les phosphatases (en gris) sont aussi incluses.



au choc osmotique (Brewster *et al.* 1993). Leurs travaux ont permis d'établir que la délétion de *PBS2* ou *HOG1* inhibait la croissance de la levure en milieu de haute osmolarité. Ces mutants adoptaient une morphologie ressemblante à une croissance pseudohyphale, ou encore à un schmoos, et n'accumulaient que la moitié du glycérol qu'accumulent les cellules sauvages en situation de choc osmotique (Brewster *et al.* 1993, Brewster *et al.* 1994, Schuller *et al.* 1994). Comme la double délétion *hog1Δpbs2Δ* provoquait le même effet qu'une des deux délétions, ces chercheurs ont conclu que ces deux protéines fonctionnaient dans la même voie de signalisation. Le fait qu'un choc osmotique provoquait une phosphorylation rapide de Hog1p de façon Pbs2p-dépendante est venu confirmer cette conclusion.

Par la suite, les travaux de Haruo Saito et de ses collègues ont permis d'identifier deux autres composantes de la voie: Sln1p et Ypd1p (Maeda *et al.* 1994, Posas *et al.* 1996). Ils ont pu établir que la délétion d'un de ces deux gènes causait la mortalité. Un criblage pour des mutations supprimant la pathologie des délétions de Sln1p et Ypd1p a permis de trouver Hog1p et Pbs2p, liant ainsi Sln1p et Ypd1p à la voie HOG. Le criblage a aussi permis d'identifier deux autres composantes: Ssk1p et la MAPKKK Ssk2p (Maeda *et al.* 1994). Ssk22p est ensuite venue se rajouter aux composantes connues de par son homologie à Ssk2p (Maeda *et al.* 1995). Des études génétiques et d'épistasie ont par la suite permis d'ordonner les composantes de ces voies de signalisation, plaçant Ssk1p en amont de Ssk2p et Ssk22p, et ces dernières en amont de Hog1p et Pbs2p (Maeda *et al.* 1995). Les mêmes chercheurs ont effectué des criblages pour des mutants sensibles au choc osmotique dans des souches de levure *ssk2Δ/ssk22Δ*, ce qui a permis d'identifier Sho1p et la MAPKKK Ste11p, ainsi que Ste50p (Posas *et al.* 1998). Enfin, l'implication de Ste20p et Cdc42p a été établie par d'autres criblages (Cvrckova *et al.* 1995). La voie HOG est au centre de la réponse au choc osmotique.

Les levures mutantes comportant une voie HOG inactivée ne sont pas capables de s'adapter de façon appropriée aux changements osmotiques. En effet, les triples mutants *ssk2Δ/ssk22Δ/ste11Δ* sont sensibles au choc osmotique et n'activent pas la

voie HOG. Diverses combinaisons de délétions de gènes de la voie HOG ont permis d'établir que deux branches indépendantes permettent à la cellule de répondre au choc, puisque les souches n'ayant qu'une des deux branches inactivées sont toujours en mesure d'activer rapidement Hog1p (Maeda *et al.* 1995).

Des mécanismes indépendants des MAPK permettent également l'adaptation au choc osmotique (Hohmann 2002). Par exemple, la protéine membranaire Fsp1p, qui est responsable de l'export du glycérol à travers la membrane, ajuste son transport en fonction du choc osmotique, augmentant celui-ci en cas de choc hypotonique et le diminuant en cas de choc hypertonique (Tamas *et al.* 1999). La voie PKA est aussi impliquée dans le changement du patron d'expression des gènes après un choc osmotique. Celle-ci est plutôt responsable des fonctions de réponse au stress, comme elle le fait pour le choc thermique, le manque de nutriments, le stress oxydatif et le niveau élevé d'éthanol (Ruis *et al.* 1995).

Enfin, mentionnons que l'homologue mammifère de HOG est la MAPK p38 (Han *et al.* 1994). On retrouve des orthologues de Hog1p dans d'autres mycètes, chez la drosophile et chez les animaux, mais pas chez les plantes (Caffrey *et al.* 1999).

Senseurs de la voie HOG

Alors que chez les cellules mammifères, la réponse au choc osmotique semble provenir d'un mécanisme non spécifique, celle de la levure est transmise par des osmosenseurs. Vu le nombre élevé de molécules pouvant stimuler la voie HOG, il est peu probable que l'osmosenseur réponde directement à un ligand, comme le font la majorité des récepteurs membranaires. Les osmosenseurs, contrairement aux chemosenseurs, ne dépendent pas directement d'un ligand, mais doivent plutôt détecter les changements des propriétés physicochimiques d'un solvant, ou encore, les changements mécaniques dus aux changements d'osmolarité et de turgescence de la cellule. On assume généralement que les osmosenseurs sont des protéines membranaires, mais il est aussi possible qu'ils soient situés à l'intérieur de la cellule

(Wood 1999). Les osmosenseurs et les mécanismes qui leur permettent de détecter les variations d'osmolarité sont encore peu connus. Des études *in vitro* sont nécessaires pour prouver le rôle d'osmosenseur d'une protéine (Rubenhagen *et al.* 2001). Comme les osmosenseurs sont fréquemment des protéines membranaires, et comme il est difficile d'étudier de tels systèmes *in vitro*, de telles données sont rares (Bill 2001). Chez *S. cerevisiae*, on a depuis longtemps assumé que les osmosenseurs sont Sho1p et Sln1p, deux protéines membranaires non reliées, chacune contrôlant une des deux branches majeures de réponse au stress osmotique.

Pour la croissance en milieu de haute osmolarité, les deux branches sont en effet redondantes. Par contre, des mécanismes indépendants de ces deux branches et impliquant d'autres protéines ont été rapportés (O'Rourke *et al.* 1998, Van Wuytswinkel *et al.* 2000), parmi lesquels se retrouve Msb2p (O'Rourke *et al.* 2002). Cette protéine membranaire interagit physiquement avec Sho1p et Cdc42p. Msb2p et Sho1p sont toutes deux nécessaires pour activer pleinement cette branche. Msb2p pourrait donc servir d'osmosenseur pour certaines voies MAPK (Cullen *et al.* 2004).

Sho1p et Sln1p ont été désignées comme osmosenseurs par défaut pour plusieurs raisons. D'abord, les deux branches qu'elles contrôlent répondent au stress osmotique (Brewster *et al.* 1993). Ensuite, des preuves génétiques placent Sho1p et Sln1p en amont de toutes les autres composantes connues de la voie HOG, et des mutations dans *SHO1* et *SLN1* affectent l'activité des deux branches (Maeda *et al.* 1994, Posas *et al.* 1997). Enfin, les deux protéines sont trans-membranaires (Ostrander *et al.* 1999, Reiser *et al.* 2000). Des études ont démontré que Sln1p serait effectivement un senseur direct de turgescence (Reiser *et al.* 2003). Les niveaux de glycérol dans la cellule semblent réguler l'activité de Sln1p, ce qui suggère que cet osmosenseur pourrait détecter les différences d'osmolarité entre les deux côtés de la membrane plutôt que simplement une plus grande osmolarité externe (Tao *et al.* 1999). Par contre, de récentes recherches nous portent à croire que Sho1p ne serait pas un senseur direct du choc osmotique (Raitt *et al.* 2000). Ces études ont démontré que Sho1p ne servirait qu'à recruter Pbs2p à la membrane, et il ne serait donc pas en

tant que tel un senseur d'osmolarité. Des études exhaustives de criblage pour une mutation conférant une sensibilité au choc osmotique dans des souches *ssk2Δ/ssk22Δ* n'ont pas pu révéler un autre senseur. Soit celui-ci est encodé par des protéines redondantes, soit la fonction est remplie par un membre connu de la voie, ou alors un autre mécanisme ne relevant pas de ces protéines est impliqué.

Les protéines membranaires de la famille Wsc, responsables de veiller à l'intégrité de la membrane, sont de possibles osmosenseurs pour la branche Sho1 (Verna *et al.* 1997). Aussi, il est bien connu qu'un choc osmotique perturbe la structure du cytosquelette (Brewster *et al.* 1994). Comme Sho1p est localisée aux endroits de la membrane plasmique où la croissance et l'expansion cellulaire se déroulent, il a été proposé que l'actine, ou un autre élément du cytosquelette, pourrait être couplé à Sho1p afin d'activer la branche Sho1 en réponse à un choc osmotique (Hohmann 2002). L'osmosenseur de cette branche pourrait donc être situé à l'intérieur de la cellule.

Activation de la branche Sho1

Sho1p est composée de quatre domaines transmembranaires du côté N-terminal, et d'un domaine SH3 cytosolique spécifique au domaine polyproline de Pbs2p. L'affinité de liaison entre Pbs2 et Sho1 est modeste, mais très spécifique, dans un environnement protéique contenant de nombreux autres domaines SH3 et polyproline (Maeda *et al.* 1995, Zarrinpar *et al.* 2003). La branche Sho1, lors d'un choc osmotique, active Pbs2p via la MAPKKK Ste11p. Sho1 aurait un site de liaison à Ste11 (Zarrinpar *et al.* 2004). Le mécanisme d'activation de Ste11p est peu connu, et implique Ste20p, Cdc42p et Ste50p, une protéine adaptatrice qui relie Ste11p et Cdc42p (Drogen *et al.* 2000). On sait que le choc osmotique mène à l'activation de Cdc42p, une GTPase, par un mécanisme encore inconnu. Cdc42p, à son tour, lie et active Ste20p (Raitt *et al.* 2000). Ensuite, Ste20p phosphoryle sa cible: Ste11p. Une fois activée, Ste11p phosphoryle Pbs2p, qui à son tour phosphoryle Hog1p.

Plusieurs interactions sont donc impliquées dans la formation du complexe de signalisation autour de Sho1.

Activation de la branche Sln1

En situation iso-osmotique, le récepteur Sln1p est actif, et s'auto-phosphoryle. Sln1p possède une activité protéine-histidine-kinase et est située à la tête d'un système de relais de groupements phosphate (Sln1p-Ypd1p-Ssk1p) similaire au système à deux composantes qu'on retrouve chez les procaryotes (Posas *et al.* 1996, West *et al.* 2001). Sln1p transmet le groupement phosphate de son domaine histidine kinase à son domaine de régulation, puis à la protéine Ypd1p, qui le relaie sur un résidu aspartate de Ssk1p (Lu *et al.* 2003). Ssk1p phosphorylée est inactive (Posas *et al.* 1996, Saito 2001, Wurgler-Murphy *et al.* 1997). En cas de choc osmotique, Sln1p adopte une conformation inactive et cesse de s'auto-phosphoryler, ce qui met fin à la cascade de phosphorylation. Ssk1p est rapidement déphosphorylée par un mécanisme encore aujourd'hui inconnu, ce qui provoque son activation. Cette protéine lie alors Ssk2p ou Ssk22p (deux MAPKKK redondantes), qui à leur tour activent Pbs2p (Maeda *et al.* 1995). La liaison Ssk1p à Ssk2p ou Ssk22p est essentielle à la transmission du signal. Toutefois, seule Ssk1p déphosphorylée est en mesure d'interagir avec ses substrats (Posas *et al.* 1998). La protéolyse de Ssk1p déphosphorylée, médiée par l'ubiquitine, est à l'origine de l'extinction du signal après que la levure s'est adaptée (Sato *et al.* 2003).

Implication des phosphatases

La phosphorylation des MAPK est régulée par des kinases, mais aussi par des phosphatases. Bien qu'on consacre plus d'attention aux kinases, l'importance des phosphatases n'en est pas moindre. Les phosphatases jouent plusieurs rôles importants dans la levure. Elles atténuent le signal de base des voies de signalisation, prévenant toute activation en absence de stimuli. Aussi, elles

préviennent une suractivation des voies après stimulation. Enfin, elles permettent aux protéines de revenir à leur état de phosphorylation normal après l'adaptation.

Il existe trois classes de phosphatases: les phosphatases à double spécificité (DSP), qui agissent autant sur les phospho-tyrosines que les phospho-thréonines (Farooq *et al.* 2004), les tyrosine-phosphatases (PTP), qui s'attaquent uniquement aux résidus phospho-tyrosine (Wurgler-Murphy *et al.* 1997, Zhan *et al.* 1997), et enfin les phosphatases de type 2C (PP2C), qui s'attaquent aux résidus phospho-thréonine et phospho-sérine, et ont une faible activité phosphatase pour les résidus phospho-tyrosine (Cheng *et al.* 1999). Chez la levure, il y a 2 DSP (Msg5p et Sdp1p), trois PTP (Ptp1p-3p), et Ptc1p-5p sont les seules PP2C dont on puisse détecter l'activité. Les DSP n'ont pas d'effet connu sur la voie HOG (Wurgler-Murphy *et al.* 1997). Ptp2p et Ptp3p, quant à elles, sont impliquées dans les cascades de MAPK. Ptp2 a une préférence pour Hog1p et Mpk1p, alors que Ptp3p a une préférence pour Fus3p (Wurgler-Murphy *et al.* 1997, Zhan *et al.* 1997). Ptc1p déphosphoryle les résidus thréonine de Hog1p *in vitro* (Warmka *et al.* 2001). Ptc2 et 3 semblent avoir le même effet (Young *et al.* 2002). Des études ont permis d'établir que Ptp2p, Ptp3p et Ptc1p-3p peuvent réguler la localisation et la durée d'activation de Hog1p phosphorylée (Mattison *et al.* 2000). On suspecte ces phosphatases d'être responsables de la boucle de rétroaction permettant de désactiver Hog1p et ses cibles (Jacoby *et al.* 1997, Wurgler-Murphy *et al.* 1997). L'effet n'est pas nécessairement spécifique, car ces phosphatases ont aussi les MAPK Fus3p, Kss1p, Slt2p et Mkp1p comme cibles. L'absence de stimulation des osmosenseurs pourrait donc être à la source de la boucle de rétroaction permettant de faire cesser le signal après l'adaptation, ou encore les deux phénomènes pourraient être mis à contribution de façon concertée. Enfin, on a proposé que Hog1p active certaines phosphatases, qui viendraient inhiber les autres voies et prévenir le débordement du signal vers ces voies, assurant ainsi en partie la spécificité de la transmission du signal (Davenport *et al.* 1999, Hall *et al.* 1996).

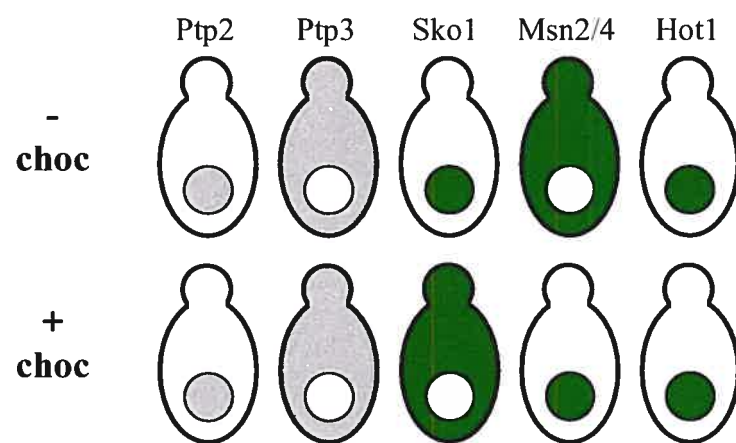
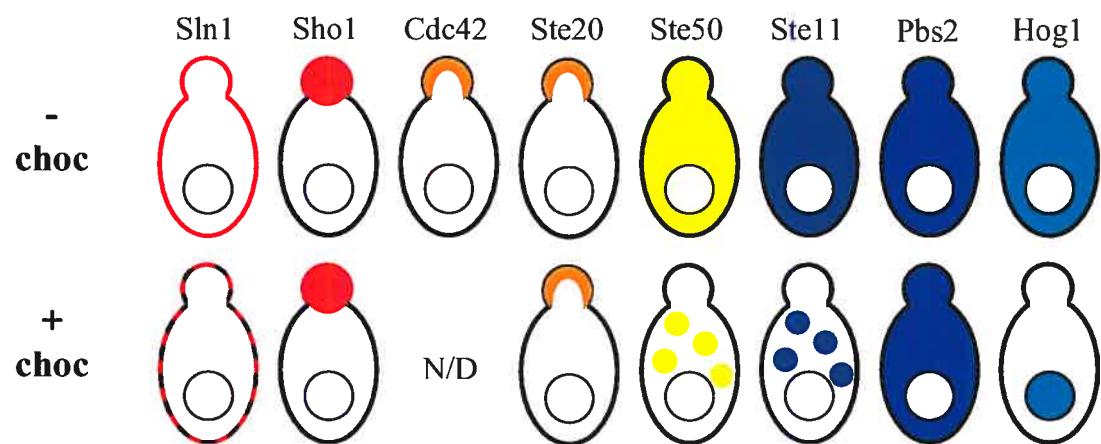
Localisation des composantes de la voie HOG

Les signaux des voies MAPK, comme bien d'autres voies de signalisation, partent de la membrane et sont dirigés vers le noyau. Dans ce procédé dynamique, les changements de localisation des diverses composantes sont tout aussi importants que les changements d'activité. Récemment, il a été possible d'observer la localisation cellulaire des diverses composantes grâce à la GFP (Figure 4). Sln1p est normalement distribué uniformément sur la membrane. Lors d'un choc osmotique, Sln1p s'agglomère à la membrane (Reiser *et al.* 2003). Sho1p est aussi située à la membrane plasmique, dans les régions de croissance polarisée, tel le bourgeon. (Reiser *et al.* 2000). Sa localisation ne change pas en cas de choc osmotique, mais elle recrute Pbs2p à la membrane, où Cdc42p et Ste20p sont situées (Raitt *et al.* 2000). Même si la localisation de Pbs2p ne semble pas être affectée par le choc osmotique, des mutants de cette protéine abrogeant sa phosphorylation s'accumulent aux sites contenant Sho1p lors d'un choc osmotique, un phénomène dépendant de Sho1p (Reiser *et al.* 2000). Ces preuves tendent à soutenir que Pbs2p interagirait de façon transitoire avec Sho1p.

Ste50p et Ste11p interagissent via leur domaine SAM. Les deux protéines sont normalement situées dans le cytoplasme. Lors d'un choc osmotique, ces deux protéines demeurent dans le cytoplasme, mais semblent former de petits agrégats localisés (Posas *et al.* 1998).

Hog1p est normalement retrouvée uniformément dans la cellule. En réponse au choc osmotique, Hog1p se rend rapidement au noyau. Seule sa phosphorylation est nécessaire à ce transit, et non pas son activité kinase. Après un retour à un milieu osmotique normal, ou après l'osmoadaptation, Hog1p sort du noyau par un procédé qui nécessite son activité kinase. Sa déphosphorylation n'est par contre pas nécessaire (Ferrigno *et al.* 1998, Reiser *et al.* 1999).

Figure 4 : Localisation subcellulaire des composantes de la voie HOG avant et après un choc osmotique (environ 10 minutes après le choc) (O'Rourke *et al.* 2002). Les cellules sont illustrées avec un bourgeon naissant (en haut) et un noyau (au centre, en bas). La localisation des protéines est identifiée par les régions de couleur correspondant à leur nomenclature. La localisation de Cdc42p après un choc osmotique n'a pas été établie.



Ptp2 est surtout située dans le noyau, alors que Ptp3 est cytoplasmique (Mattison *et al.* 1999). Leur localisation ne change pas en réponse au stress osmotique, ni tout autre stimulus des MAPK. Cette différence dans leur localisation pourrait être à la responsable de la spécificité du rôle de ces phosphatases (Mattison *et al.* 2000).

Hog1p module l'activité de nombreux récepteurs nucléaires. Le répresseur de transcription Sko1p est normalement situé dans le noyau. Par contre, lors d'un choc osmotique sévère, il en est rapidement exporté et se retrouve dans le cytoplasme (Pascual-Ahuir *et al.* 2001). Les protéines à doigt de zinc Msn2p et Msn4p sont cytoplasmiques, mais sont rapidement transportées vers le noyau en réponse au stress osmotique ou à d'autres formes de stress (Gorner *et al.* 1998). Hot1p, quant à elle, se retrouve dans le noyau indépendamment des conditions osmotiques (Rep *et al.* 1999).

Deux voies non redondantes

La découverte de deux branches en apparence redondantes permettant de contrôler la réponse au choc osmotique via les voies de signalisation MAPK a soulevé une importante question: pourquoi la levure a-t-elle conservé ou créé cette redondance au cours de son évolution, et quel avantage est-ce que cette complexité accrue lui apporte? Il est difficile de concevoir que la levure ait maintenu, au cours de son évolution, deux branches parfaitement redondantes pour activer Pbs2p sans raison. Pour expliquer ce paradoxe, on a proposé que la sensibilité des deux branches aux chocs osmotique était différente, permettant à la cellule de s'adapter à une plus grande gamme de variation d'osmolarité (Maeda *et al.* 1995). De nombreuses preuves viennent soutenir cette hypothèse. D'abord, dans des souches *ssk2Δ/ssk22Δ*, chez qui la réponse au choc osmotique dépend de la voie Sho1, la phosphorylation de Hog1p survient lorsque les cellules sont exposées à 300mM NaCl, alors que pour les souches *ssk22Δ/sho1Δ*, chez qui la réponse dépend de la branche Sln1, elle survient à 100mM (Maeda *et al.* 1995). La branche Sln1 serait donc plus sensible aux petites variations osmotiques du milieu. Elle est toutefois

nécessaire pour activer l'expression de certains gènes en réponse à une forte osmolarité. Cette branche couvrirait donc une plus grande gamme d'osmolarité. Les différences de sensibilité des deux voies pourraient s'expliquer par le fait qu'elles sont activées par des stimuli différents. Aussi, la branche Sho1 a une réponse binaire au choc osmotique, s'activant brusquement passé son seuil d'activation, alors que la branche Sln1 a une réponse dose-dépendante, le signal provenant de cette voie augmentant peu à peu au fur et à mesure que l'osmolarité du milieu change. On a de plus noté que de petits chocs osmotiques font varier la proportion de Hog1p phosphorylée, alors que pour de grosses variations, où pratiquement tout le pool de Hog1p cellulaire est phosphorylé, c'est plutôt la durée d'activation de Hog1p qui varie (Hohmann 2002). En somme, les deux branches de la voie HOG permettent d'orchestrer la réponse osmotique et d'intégrer les contraintes internes et externes de la cellule afin de maintenir la turgescence nécessaire à la croissance.

Conséquences de l'activation de la voie HOG

L'activation de Pbs2p est une conséquence de sa phosphorylation sur ses résidus Ser154 et Thr518 par l'une des 3 MAPKKK: Ste11p, Ssk2p ou Ssk22p (Posas *et al.* 1997). Pbs2p active phosphoryle Hog1p sur ses deux résidus Thr174 et Tyr176 (Jacoby *et al.* 1997), et Hog1p est alors transportée vers le noyau (Ferrigno *et al.* 1998, Reiser *et al.* 1999). La protéine Pbs2p est cytoplasmique et semble être exclue du noyau. La phosphorylation de Hog1p survient donc dans le cytosol (Reiser *et al.* 1999). Hog1p active entre dans le noyau en moins d'une minute après un choc osmotique. (O'Rourke *et al.* 2004). Plus le choc est sévère, plus le temps de transit vers le noyau est long, et plus l'expression des gènes cibles de Hog1p est retardée (Rep *et al.* 1999). Dépendamment de la sévérité du choc, Hog1p demeure active dans le noyau pour une durée de quelques minutes à quelques heures (Mattison *et al.* 2000). Une portion de Hog1p demeure tout de même dans le cytosol lors d'un choc osmotique, car Hog1p y effectue d'autres fonctions (Teige *et al.* 2001). Dans les mutants *ssk2Δ/ssk22Δ/ste11Δ*, chez qui les deux branches Sho1 et Sln1 sont inactives, Hog1p est tout de même activée par phosphorylation lors de chocs

osmotiques allant au-delà de 1.4M NaCl (Van Wuytswinkel *et al.* 2000). Ce curieux phénomène pourrait être dû à un mécanisme jusqu'ici inconnu, ou simplement à l'auto-phosphorylation de Hog1p. Cette dernière hypothèse est plausible si on considère que tout comme ERK1, Hog1p contient un domaine de dimérisation, bien qu'il n'ait pas été démontré *in vivo* que Hog1 dimérise (Khokhlatchev *et al.* 1998). La voie HOG a aussi un rôle biologique même en absence de choc osmotique (Aguilera *et al.* 2005, Garcia-Rodriguez *et al.* 2000, Reynolds *et al.* 1998).

De nombreuses études ont caractérisé l'impact de l'activation de la voie HOG sur la transcription (Causton *et al.* 2001, Gasch *et al.* 2000, Posas *et al.* 2000, Rep *et al.* 2000, Yale *et al.* 2001). Hog1p activée contrôle l'activité de plusieurs activateurs ou répresseurs de la transcription et augmente l'expression d'environ 10% des gènes de la levure (soit environ 600 gènes). La fonction des gènes cibles de cette voie confirme son implication dans la réponse au choc osmotique. Plus de la moitié du génome est impliqué dans les diverses réponses aux changements de l'environnement en général (Causton *et al.* 2001). Hog1p accomplit ces changements via quatre activateurs de transcription (Hot1p, Smp1p, Msn2p et Msn4p) et un répresseur (Sko1p) (Alepuz *et al.* 2003, de Nadal *et al.* 2003, Proft *et al.* 1999, Proft *et al.* 2002, Rep *et al.* 2000, Rep *et al.* 1999). Ce changement massif du patron d'expression des gènes serait le reflet des changements métaboliques requis pour permettre l'osmoadaptation. On en connaît moins sur la réponse au choc hypotonique. L'analyse globale du patron d'expression des gènes après un choc hypotonique n'a pas révélé de patron spécifique de réponse, mais plutôt une régulation à la baisse de tous les gènes normalement activés par un choc hypertonique (Gasch *et al.* 2000).

L'activation de Hog1p a aussi d'autres conséquences importantes sur la physiologie et le métabolisme de la cellule. Après un stress osmotique, une chute transitoire de la synthèse protéique a lieu. Il ne semble pas que Hog1p soit impliqué dans cette chute, mais elle serait plutôt nécessaire à la reprise de la synthèse protéique (Uesono *et al.* 2002). Un choc osmotique provoque également un arrêt transitoire du cycle

cellulaire, les cellules cessant leur progression en phases G1 ou G2-M jusqu'à l'adaptation (Alexander *et al.* 2001). Enfin, les fortes concentrations ioniques présentes après un choc osmotique, causent la dissociation de plusieurs protéines de la chromatine de façon non spécifique. Hog1p procure une certaine protection contre cet effet en phosphorylant Nha1p et Tok1p, des canaux ioniques transportant les ions Na⁺ et K⁺. Ceci a pour effet de stimuler l'efflux de ces ions (Proft *et al.* 2004).

Voies MAPK et spécificité du signal

La découverte des diverses composantes faisant partie de la voie HOG et des autres voies MAPK ainsi que la caractérisation de la fonction de ces composantes a soulevé une question importante qui s'applique non seulement à ces voies, mais aussi à toutes les voies de signalisation des organismes vivants : celle de la spécificité du signal. Comme les voies MAPK partagent de nombreuses composantes, les chercheurs se sont demandé comment la cellule était capable d'intégrer une myriade de stimuli en réponses spécifiques via des composantes partagées. Chez les levures sauvages, on n'observe pas de débordement du signal vers les autres voies MAPK lorsque la voie HOG est activée (Davenport *et al.* 1999, Jansen *et al.* 2001, Posas *et al.* 1997). Pourtant, Ste11p et Ste20p, qui activent la voie HOG, sont aussi impliquées dans l'activation des autres voies MAPK. Aussi, on observe un débordement dans les souches où Hog1p ou Pbs2p mutées sont incapables d'activer la réponse au choc (Davenport *et al.* 1999, Hall *et al.* 1996, Madhani *et al.* 1997, O'Rourke *et al.* 1998). La fréquence de tels phénomènes de partage des composantes dans les voies de signalisation en général rend la question de la spécificité du signal d'autant plus pertinente. Encore une fois, les voies MAPK de *S. cerevisiae* se sont avérées être d'excellents modèles nous permettant de répondre à cette question.

Plusieurs mécanismes permettant d'assurer la spécificité du signal ont été proposés. Sans contredit, le plus important de ces mécanismes est l'utilisation de protéines

d'échafaudage (Pawson *et al.* 1997). Ces protéines, capables de lier plusieurs protéines d'une voie de signalisation, ont pour fonction de rapprocher physiquement les composantes et, par la spécificité de leurs domaines de liaison, favoriser l'activation d'une voie spécifique, ségréguant ainsi le signal dans une seule voie (Ptashne *et al.* 2003, van Drogen *et al.* 2002). Ste5p est la première protéine d'échafaudage à avoir été identifiée comme tel. Elle assure la spécificité du signal dans la voie de réponse aux phéromones (Elion 2001). Pbs2p est la protéine échafaud de la voie HOG, liant Sho1p à l'activation de Ste11p et prévenant les débordements de signalisation vers les autres voies en permettant aux composantes de la voie d'être rapprochées (Posas *et al.* 1997). Cette idée est supportée par des études où des fusions entre Ste11p et Pbs2p ne permettent que l'activation de la voie HOG, alors que des fusions entre Ste11p et Ste7p ne permettent que d'activer la voie de réponse aux phéromones (Harris *et al.* 2001). Aussi, la délétion de ces protéines échafaud provoque des signaux erronés transmis d'une voie à l'autre, soulignant l'importance qu'ont ces protéines au niveau de la spécificité du signal (Madhani *et al.* 1997, O'Rourke *et al.* 1998).

Parmi les autres mécanismes assurant la spécificité du signal, on retrouve la spécificité kinase-substrat, la spécificité différente des MAPK pour les facteurs de transcription en amont des voies de signalisation, les interactions coopératives médiées par des domaines modulaires favorisant la colocalisation des protéines de signalisation, et finalement l'action des phosphatases (voir la section sur les phosphatases ci-haut). Récemment, il a été proposé que les MAPK pourraient aussi affecter l'activité des cibles des autres MAPK, en stimulant leur dégradation (Bao *et al.* 2004, Chou *et al.* 2004). Ces mécanismes sont probablement les attributs généraux qui permettent d'assurer un flux spécifique de l'information à travers les voies de signalisation. Même si les protéines échafauds peuvent assurer en grande partie la spécificité des voies MAPK, la spécificité des MAPK pour leurs substrats et les phosphatases impliquées dans les boucles de rétroaction pourraient être tout aussi importantes, autant chez la levure que chez d'autres organismes vivants (Chang *et al.* 2001).

Études statiques et dynamiques

Les études génétiques et les études d'épistasie qui ont permis d'élucider l'organisation de la voie HOG sont basées en grande partie sur des données statiques, qui négligent souvent l'aspect dynamique et même spatial des voies de signalisation. Le modèle du comportement dynamique actuel de ces voies est en grande partie déduit de ces données. La biologie des systèmes nous pousse à rejeter les modèles classiques de signalisation, présentés sous forme de schémas représentant des protéines reliées par des flèches et alignées en cascade. On sait aujourd'hui que ces modèles rigides ne reflètent pas entièrement tous les enjeux concernant les voies de signalisation, et que la réalité est en fait bien plus complexe. Un appel criant s'est donc fait entendre de la part de la communauté scientifique afin de développer des outils et des techniques nous permettant non seulement d'étudier les voies de signalisation de façon dynamique, mais aussi de trouver des façons de les représenter et les conceptualiser d'une façon qui serait un meilleur reflet de la réalité cellulaire. Plusieurs techniques et méthodes ont été mises au point afin d'atteindre ce but, et l'intégration de la bioinformatique est venue révolutionner notre façon de représenter les voies de signalisation (Droit *et al.* 2005).

Méthodes de détection d'interactions protéine-protéine

Comme les interactions entre protéines sont à la base de la grande majorité des phénomènes se déroulant dans les voies de signalisation, leur étude permet d'obtenir beaucoup d'informations sur la fonction des protéines. Les protéines s'assemblent fréquemment en complexes afin d'effectuer leur fonction. L'étude de leurs interactions est donc une méthode tout indiquée pour nous permettre de percer les mystères de l'organisation dynamique des voies de signalisation et en apprendre plus sur la fonction de ces protéines dans le contexte cellulaire. Il existe de nombreuses techniques permettant d'étudier les interactions entre protéines. Par le passé, des méthodes classiques comme l'immunoprécipitation, ou la

chromatographie par affinité ont été utilisées pour étudier les interactions. Par contre, vu la quantité de plus en plus importante de protéines à caractériser, de nouvelles méthodes plus adaptées à l'étude à grande échelle ont dû être développées. De plus, des méthodes permettant la détection *in vivo* plutôt qu'*in vitro* des interactions étaient souhaitables afin de permettre d'étudier les complexes de protéines dans leur environnement natif.

Les travaux pionniers de Stanley Fields et ses collègues ont permis de mettre au point une technique qui encore aujourd'hui est la méthode la plus connue permettant de détecter des interactions protéine-protéine *in vivo* à plus grande échelle: le double-hybride (Fields *et al.* 1989). Elle se base sur l'expression d'un gène rapporteur, dans le noyau de la levure, activé par la reconstitution de deux domaines d'un activateur de transcription couplés aux protéines d'intérêt. Cette méthode a été utilisée pour cartographier le protéome en entier de la levure *S. cerevisiae* (Ito *et al.* 2000, Uetz *et al.* 2000), procurant aux chercheurs une quantité impressionnante de données concernant les interactions entre protéines. Cette méthode a toutefois ses désavantages. Les interactions doivent avoir lieu dans le noyau, et les protéines d'intérêt doivent donc pouvoir s'y rendre et y interagir. Aussi, cette méthode engendre de nombreux faux positifs qui viennent contaminer les banques de données d'interactions protéine-protéine. Malgré tout, le double-hybride est une méthode robuste largement répandue et utilisée (Pandey *et al.* 2000).

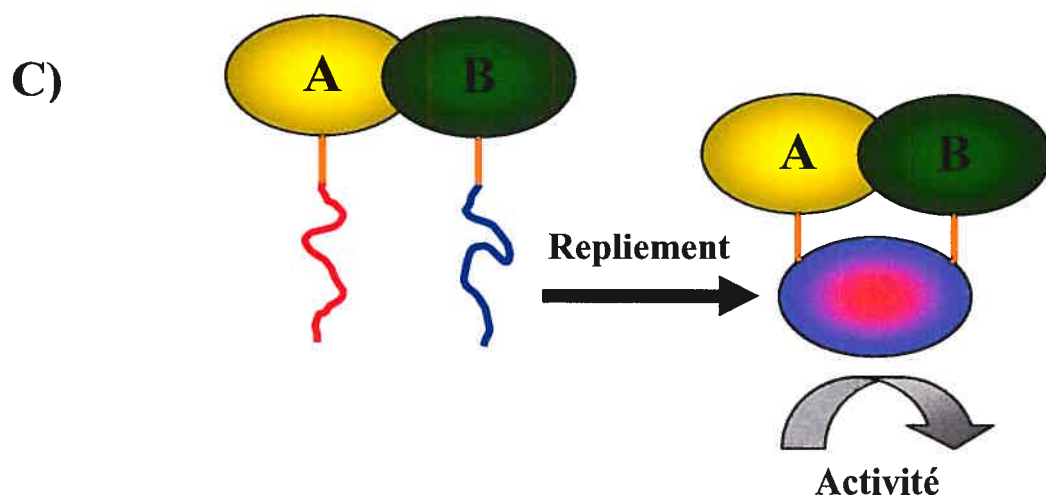
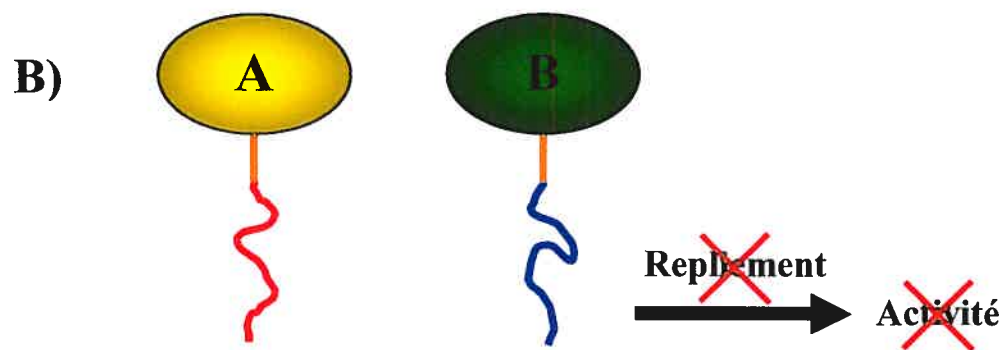
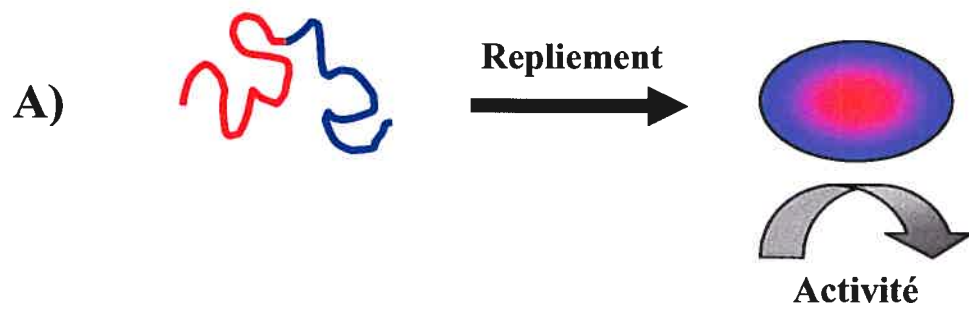
Le FRET, dont le principe a été formulé par Förster en 1958, et son petit frère le BRET, sont une autre famille de méthodes permettant de détecter les interactions entre protéines (Angers *et al.* 2000, Truong *et al.* 2001). Ces méthodes se basent sur la détection du transfert d'énergie de la fluorescence ou la bio-luminescence entre deux protéines fusionnées aux protéines d'intérêt. Ces méthodes produisent également des faux positifs, et sont limitées par les contraintes stériques et l'absence d'amplification du signal (dans le cas du FRET).

Plus récemment, de nouvelles méthodes basées sur l'utilisation de la spectrométrie de masse ont vu le jour. Parmi celles-ci, la méthode TAP-TAG est sans doute celle dont l'usage est le plus répandu (Rigaut *et al.* 1999). Dans ces méthodes, une protéine d'intérêt est fusionnée à un ou plusieurs appâts qui sont utilisés pour purifier la protéine par chromatographie d'affinité. On utilise ensuite la spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines ayant coprécipité avec la protéine d'intérêt. Le TAP-TAG est une méthode très sensible et facilement adaptable à une plus grande échelle. Par contre, les protéines doivent être extraites des cellules, avec des conséquences implicites sur les possibilités de faux positifs et de faux négatifs inhérentes aux méthodes utilisant des purifications *in vitro*. L'étude du comportement dynamique des interactions est également plus difficile.

Enfin, il existe aussi des méthodes basées sur la reconstitution de deux fragments d'une protéine rapporteuse fusionnés aux protéines d'intérêt (Ghosh *et al.* 2000). Parmi celles-ci, le Protein-Fragment Complementation Assay (PCA) est une technique qui a été mise au point par notre laboratoire (Figure 5). De nombreux PCA ont été mis au point, chacun faisant usage d'une protéine rapporteuse différente. Le PCA basé sur la reconstitution de l'activité de la dihydrofolate réductase (DHFR), une enzyme dont l'activité est essentielle à la survie de l'organisme hôte, est le premier PCA ayant été développé (Pelletier *et al.* 1998). Cette méthode a été employée dans divers organismes : cellules mammifères (Remy *et al.* 1999), végétales (Subramaniam *et al.* 2001), bactériennes (Pelletier *et al.* 1998) et chez la levure (présent ouvrage, données non publiées). Elle a également été utilisée à plus grande échelle pour cribler une librairie de mutants (Pelletier *et al.* 1999).

Un PCA basé sur la reconstitution de l'activité de l'enzyme Beta-lactamase a également été développé au laboratoire (Galarneau *et al.* 2002). Alors que le PCA DHFR permet la détection d'interaction par la croissance ou l'absence de croissance des cellules, le PCA Beta-lactamase permet la détection d'interactions par l'entremise d'une réaction enzymatique dont le produit est fluorescent. Un PCA

Figure 5 : Principes généraux du PCA (Michnick 2004). **A)** La protéine rapporteuse, qui doit être petite et monomérique, a comme toutes les autres protéines un mécanisme de repliement qui lui permet d'atteindre sa conformation native et d'effectuer sa fonction. **B)** Dans un PCA, cette protéine est scindée en deux fragments de façon rationnelle, en prenant soins de choisir une boucle externe de la protéine afin de perturber sa structure native aussi peu que possible. Ces deux fragments sont ensuite fusionnés aux protéines d'intérêt A et B via un lien polypeptidique souple (ici en orange). Si les protéines d'intérêt n'interagissent pas, alors la protéine rapporteuse ne peut se replier, et son activité n'est pas détectable. **C)** Si les protéines A et B interagissent, le rapprochement spatial des deux protéines permet de reformer artificiellement le lien peptidique brisé de la protéine rapporteuse, ce qui laisse celle-ci se replier. On peut alors détecter son activité.



basé sur la reconstitution de la GFP et ses variantes a aussi été élaboré (Ghosh *et al.* 2000, Remy *et al.* 1999). Enfin, un PCA utilisant la luciférase de *Renilla* est en cours de développement.

Le PCA par fluorescence

Le PCA par fluorescence (ou PCA GFP) conserve les mêmes principes généraux que les autres formes de PCA, et utilise comme protéine rapporteuse la GFP ou l'une de ses variantes. La GFP est scindée en deux fragments, la coupure se trouvant entre les acides aminés 157 et 158, situés sur une boucle extérieure de la protéine. Il a été prouvé que ces deux fragments seuls n'étaient pas en mesure de reconstituer une GFP fluorescente, alors que s'ils sont fusionnés à deux protéines qui interagissent entre elles, le repliement est permis (Ghosh *et al.* 2000). Des essais de PCA par fluorescence dans les cellules mammifères ont déjà été rapportés dans la littérature, mais aucun essai dans la levure n'a été publié.

Le PCA appliqué dans la levure a de nombreux avantages. D'abord, les protéines de fusion sont exprimées dans leur milieu natif, et la détection de leurs interactions a lieu *in vivo*. Les protéines sont donc libres de circuler normalement dans la cellule, ce qui permet une détection des interactions dans leur contexte biologique. Il est conséquemment possible d'observer, par microscopie, la localisation des interactions. Par exemple, la détection d'interactions entre protéines situées à la membrane est possible, à condition que les deux fragments se retrouvent dans le même compartiment cellulaire, et qu'ils n'entravent pas le signal de localisation à la membrane de la protéine d'intérêt. Ensuite, la détection des interactions et l'observation de leur localisation peuvent se faire en temps réel, et ne sont pas indirectes, comme c'est le cas pour les rapporteurs activés par transcription, par exemple. Enfin, cette technique est peu coûteuse et simple, ce qui en fait un bon candidat pour les applications à large échelle (Michnick 2003).

Cette technique a tout de même ses limites. Contrairement à d'autres PCA, l'usage de la GFP comme protéine rapporteuse diminue sa sensibilité, car le signal provenant d'une paire d'interactions n'est pas amplifié, comme c'est le cas pour les rapporteurs enzymatiques. Aussi, comme pour tous les PCA, la possibilité demeure que l'interaction ne puisse être détectée à cause de la disposition stérique des protéines d'intérêt, ce qui mène à des faux négatifs. Le lien peptidique qui raccorde les protéines d'intérêt aux fragments a pour but de diminuer cet effet. La longueur de ce lien et son contenu en acides aminés sont d'une grande importance. Le lien peptidique idéal est soluble, flexible, n'est pas la cible de protéases, et est assez long pour permettre à la protéine rapporteuse de se replier sans obstruction, mais pas trop long pour minimiser les repliements dus aux interactions indirectes (Remy *et al.* 1999). Il n'est toutefois pas possible d'affirmer qu'une interaction détectée par PCA soit nécessairement directe, puisque certaines configurations spatiales dans les complexes d'interaction rapprochant suffisamment les deux fragments pourraient permettre la détection d'interactions indirectes. Il est aussi possible de minimiser le nombre de faux négatifs dus à l'encombrement stérique en fusionnant les fragments aux côtés C-terminal et N-terminal des protéines d'intérêt, diminuant ainsi la possibilité que l'interaction ne vienne empêcher le repliement des fragments.

Depuis le sous-clonage du cDNA de la GFP en 1992 (Prasher *et al.* 1992), de nombreux travaux ont permis d'améliorer les propriétés de cette protéine en tant que rapporteur. Aujourd'hui, il existe de nombreux mutants de la GFP ou de la RFP, chacune ayant des propriétés spectrales distinctes (Tsien 2005). Les protéines fluorescentes ont aussi été adaptées afin d'optimiser leur expression hétérologue dans d'autres organismes. La construction de variantes optimisées pour l'expression dans la levure a permis d'augmenter significativement le niveau d'expression de ces protéines dans les levures (Cormack *et al.* 1997). À partir de ces variantes optimisées, des chercheurs ont étudié différentes variantes de la GFP et la YFP, dont la Venus, la Citrine, et la yEGFP (Sheff *et al.* 2004). Les mutations qui distinguent ces diverses protéines affectent les propriétés de repliement, de résistance au pH, aux ions de Chlore, aux températures élevées ainsi que les propriétés spectrales du

fluorophore. Aussi, ces chercheurs ont fait l'usage d'une mutation (A206R) qui a pour but de drastiquement diminuer la propension qu'ont les protéines fluorescentes à se dimériser à haute concentration. Les protéines ainsi mutées sont affublées d'un « m » au début de leur désignation, indiquant leur nature monomérique. Cette mutation est d'autant plus importante pour le PCA, car des rapporteurs capables de dimériser peuvent nuire à la formation et à la stoechiométrie des complexes. Ces versions optimisées sont environ deux fois plus brillantes que les fluorophores non optimisés. L'amélioration des propriétés de la GFP a donc permis d'augmenter de façon significative la sensibilité des techniques qui en font usage.

Le PCA par fluorescence appliqué à la cartographie des voies de signalisation

Dans la perspective de la biologie des systèmes, qui vise à intégrer nos connaissances au niveau des voies de signalisation, nous souhaitons mettre en place une méthode permettant de cartographier, à grande échelle, *in vivo*, les interactions entre les complexes de protéines. Afin de mettre cette approche au point, nous avons choisi la levure comme modèle. La levure est un modèle simple et facile d'utilisation, et plusieurs de ses voies de signalisation sont conservées dans les organismes Eucaryotes. Comme la voie HOG se trouve parmi les voies de signalisation les mieux caractérisées de *S. cerevisiae*, cette voie a été choisie comme modèle pour nous permettre de confirmer la capacité du PCA par fluorescence à détecter des interactions dans cet organisme.

Le PCA par fluorescence n'ayant jamais été utilisé dans la levure, il nous a d'abord fallu établir quelle méthode d'expression des protéines de fusion était la mieux adaptée à un essai PCA. La levure est un outil génétique puissant où les possibilités de manipulation du génome et de l'expression des gènes sont multiples. Deux possibilités s'offraient à nous pour nous permettre d'y exprimer les protéines de fusion. D'abord, le vecteur d'expression le plus répandu est le plasmide, qui permet de contrôler le niveau d'expression via un promoteur inductible ou un promoteur constitutif. Cette méthode répandue requiert la construction des plasmides par

biologie moléculaire, dans une bactérie, puis l'insertion facile des constructions finales par transformation dans la levure (Figure 6). Il est aussi possible de transformer la levure avec une cassette de recombinaison homologue contenant le fragment du rapporteur flanqué des régions homologues au 3' de l'ADN codant pour le gène d'intérêt, insérant ainsi directement sur le génome, sous contrôle du promoteur endogène, la protéine de fusion (Figure 7).

La seconde approche offre un avantage majeur sur la première : comme les protéines de fusion se retrouvent sous le contrôle du promoteur naturel du gène d'intérêt, le niveau d'expression et le patron d'expression demeurent sensiblement identiques à celui du gène sauvage. Comme notre approche vise à étudier le comportement de systèmes dont chaque étape de régulation est importante, une approche où la sonde perturbe le système le moins possible et conserve tous les mécanismes pouvant être des cibles de régulation est souhaitable.

En second lieu, il nous fallait choisir quelle variante de la GFP, parmi celles mises à notre disposition, émettait un signal PCA maximal. Peu importe la méthode d'expression choisie pour les protéines de fusion, il est tout de même possible que le PCA atteigne sa limite de sensibilité si seulement une partie des protéines d'intérêt interagissent. Afin de minimiser de telles possibilités, il nous fallait déterminer pour quel rapporteur la fluorescence du PCA était la plus élevée. Des recherches menées dans la levure ont pu déterminer que la Citrine et la Venus émettaient un signal de fluorescence plus puissant que les autres variantes, la Citrine ayant un maigre avantage sur la Venus (Sheff *et al.* 2004). Comme la fluorescence de la protéine rapporteuse pleine longueur n'est pas nécessairement garante de son signal PCA, nous avons choisi de comparer les protéines les plus prometteuses (mCitrine, Citrine, Venus et yEGFP) dans un essai PCA. Pour cet essai, nous avons choisi d'utiliser Ras et le RBD de Raf comme protéines d'intérêt, puisque l'interaction entre ces deux protéines est bien caractérisée, et est de haute affinité (KD~20nM) (Herrmann *et al.* 1996).

Figure 6 : Principes du PCA par fluorescence chez la levure basé sur l'expression à partir de plasmides. L'ADN codant pour les protéines d'intérêt A et B (ici en jaune et vert) est sous-cloné dans un vecteur d'expression, en phase avec les fragments de la GFP (ici en bleu et rouge), unis par un lien peptidique souple (ici en orange). Ces constructions sont transformées dans des levures haploïdes (*Mata/Mata*). Comme le vecteur possède un marqueur de résistance (ici en mauve), il est possible de sélectionner les levures ayant intégré le plasmide avec succès. Les souches positives sont ensuite croisées entre elles afin d'obtenir dans une cellule diploïde les deux gènes fusionnés aux deux fragments de la GFP. Si les deux protéines d'intérêt interagissent, le repliement de la GFP est permis, et on peut détecter sa présence par fluorescence.

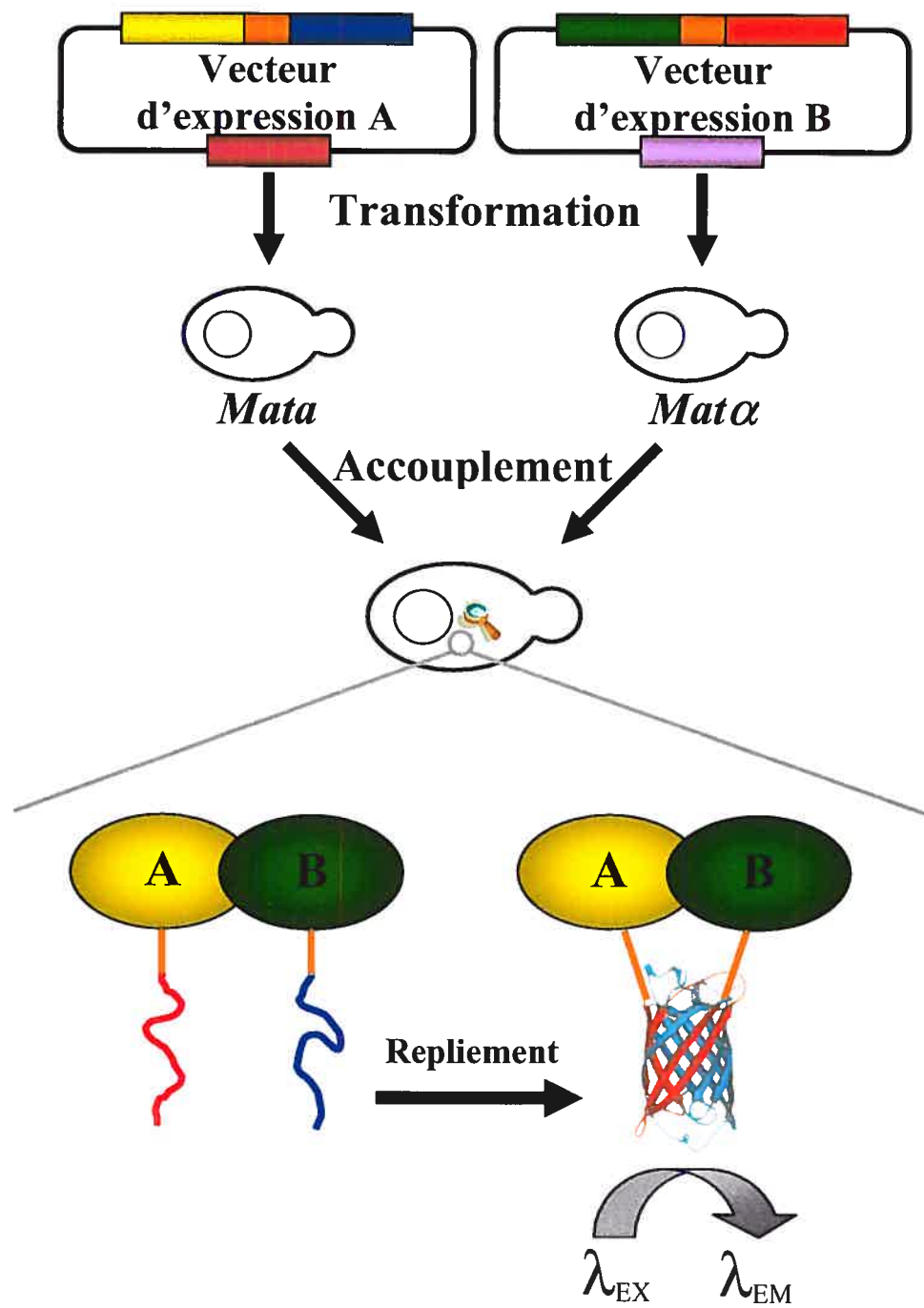
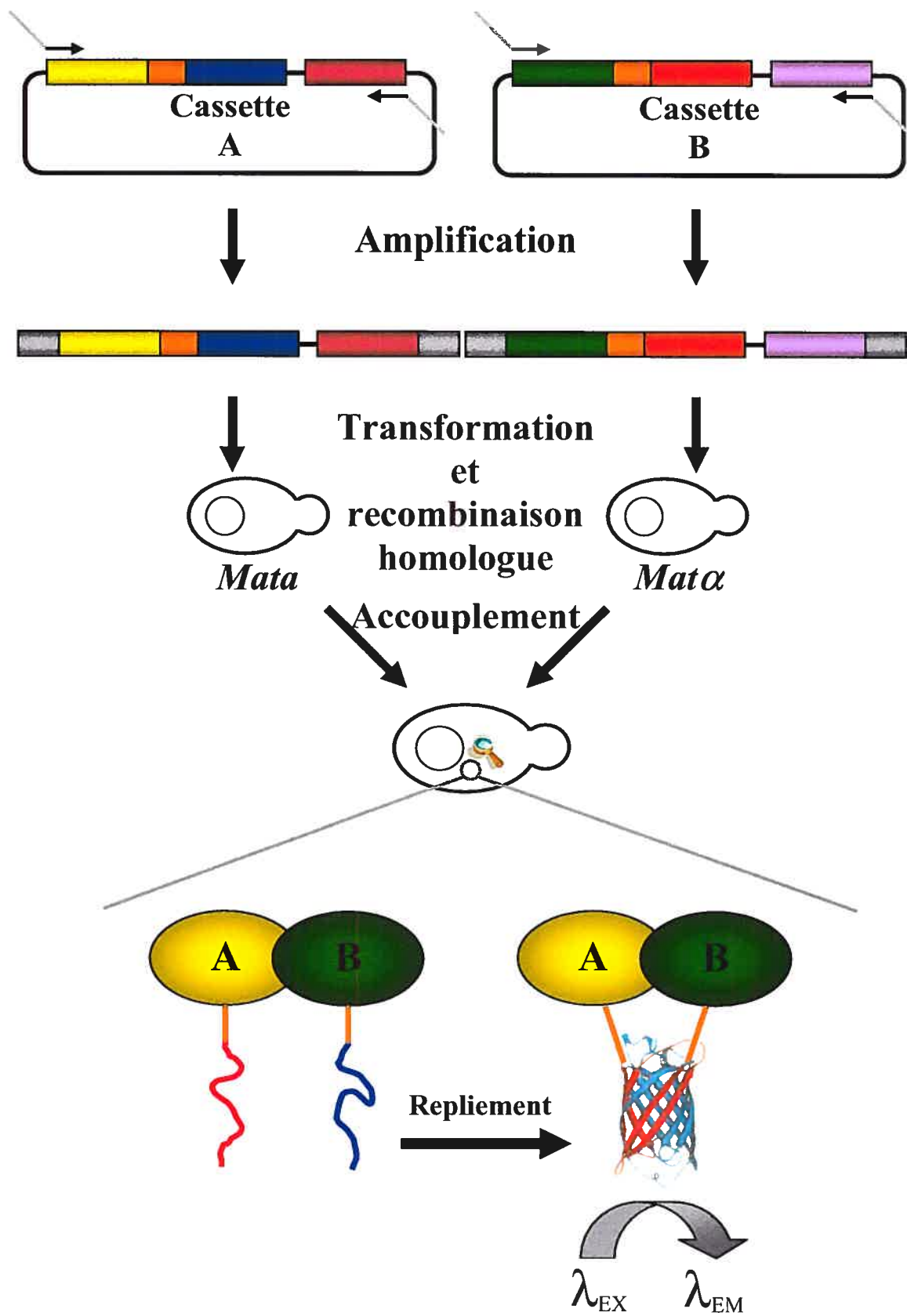


Figure 7 : Principes du PCA par fluorescence chez la levure basé sur la recombinaison homologue et l'expression sous contrôle du promoteur endogène. Les fragments de la GFP (ici en bleu et rouge) sont sous-clonés dans une cassette, en phase avec un lien peptidique souple (ici en orange). La cassette inclut aussi un marqueur de sélection (en mauve). Ces cassettes sont amplifiées par PCR en ajoutant, aux extrémités, les séquences homologues au 3' du gène d'intérêt (en gris). On transforme ensuite ces cassettes dans des levures haploïdes (*Mata/Mat α*). La recombinaison homologue, un mécanisme naturel chez la levure, permet d'insérer les cassettes via les régions d'homologie avec le gène, en 3' de celui-ci. Une fois sélectionnées et diagnostiquées pour la présence de l'insert, les souches positives sont ensuite croisées entre elles afin d'obtenir dans une cellule diploïde les deux gènes d'intérêt fusionnés aux deux fragments de la GFP sous contrôle du promoteur endogène. Si les deux protéines d'intérêt interagissent, le repliement de la GFP est permis, et on peut détecter sa présence par fluorescence.



Avec un système d'expression et un rapporteur adéquat en main, nous souhaitons établir la capacité de la méthode PCA choisie à détecter des interactions établies dans la littérature entre différentes composantes de la voie de signalisation modèle choisie: la voie HOG. Cette cartographie nous permettrait d'établir la capacité du PCA à détecter des interactions de façon fiable. Nous souhaitons également voir si le PCA permet de détecter des interactions qui jusqu'ici n'ont pas été rapportées. De telles cartes statiques sont utiles pour jeter des liens de fonctions entre les partenaires d'interaction.

Enfin, dans le but de réconcilier la cartographie d'interactions avec les objectifs de la biologie des systèmes, nous souhaitons profiter des avantages inhérents du PCA par fluorescence pour cartographier dynamiquement des voies de signalisation. Nous voulons utiliser cette méthode afin d'observer directement et en temps réel l'effet de perturbations sur les voies de signalisation. Les informations fournies par une telle cartographie peuvent être intégrées, à l'aide de la bio-informatique, dans un modèle mathématique capable de représenter le comportement dynamique observé de la voie. Contrairement aux cartes d'interactions statiques, qui permettent d'établir des liens de fonction entre les protéines, une carte dynamique voit plutôt chaque paire d'interactions comme une sonde capable de rendre compte de l'état actuel d'un complexe de protéines, procurant une vue d'ensemble sur les comportements dynamiques des voies de signalisation. Comme il est expérimentalement facile de l'activer et de la perturber, la voie HOG a été choisie comme modèle. L'objectif est de vérifier la viabilité de notre approche dans un système simple pour éventuellement l'utiliser dans d'autres organismes plus complexes et sur plusieurs voies de signalisation à la fois.

Les modèles choisis comportent souvent des compromis. Malgré tous ses avantages, il est bien établi que la voie HOG réponds très rapidement aux perturbations osmotiques. Il est donc envisageable que certaines des interactions apparaissent ou disparaissent de façon transitoire. Ceci pose problème, puisque le PCA par fluorescence est limité dans sa capacité à détecter les interactions transitoires par la

vitesse de repliement des fragments du fluorophore. Bien que plusieurs mutations apportées à la GFP et ses variantes viennent améliorer les propriétés de repliement de la protéine pleine longueur (les variantes utilisées dans la présente recherche se repliant dans l'ordre de quelques minutes), il est difficile de spéculer sur la vitesse de repliement des fragments fusionnés après induction d'une interaction des protéines d'intérêt auxquels ils sont accrochés. Toutefois, il est aussi envisageable que certaines interactions, qui ne soient pas ou peu transitoires, apparaissent ou disparaissent dans un ordre de vitesse plus long que celui du repliement des fragments. Aussi, il demeure possible que, pour une MAPK donnée, seul un petit nombre de protéines soit impliqué dans la transmission du signal et dans les changements dynamiques d'interactions. Dans un tel cas, le PCA par fluorescence, qui est déjà très peu sensible, pourrait voir son signal positif être masqué par le bruit de fond provenant de l'autofluorescence des cellules. Malgré toutes ces limites, la voie HOG demeure la voie la mieux caractérisée chez la levure, ce qui nous a poussé à la choisir comme voie modèle. Comme très peu de choses sont connues sur la dynamique des interactions entre les protéines de la voie HOG, la seule façon de vérifier la capacité du PCA à détecter de tels changements dynamiques était de le vérifier expérimentalement.

Matériel et méthodes

Souches bactériennes, souches de levure et conditions de culture

Pour permettre la construction des divers plasmides par biologie moléculaire, la souche DH5 α (Stratagene) a été utilisée. Ces bactéries ont été cultivées dans du milieu LB (1% Bacto-tryptone, 0.5% extrait de levure, 1% NaCl) ou sur des pétris LB agar (Bacto-tryptone, 0.5% extrait de levure, 1% NaCl, 1.5% agar). Les plasmides utilisés contiennent un marqueur de résistance à l'ampicilline. Les bactéries transformées ont donc été cultivées en présence de 100 μ g/ml d'ampicilline.

Des levures haploïdes de souche BY4742 (*Mata*) et BY4743 (*Mata*) ont été utilisées pour les essais PCA. Ces souches contiennent des délétions qui les rendent sensibles à l'absence de molécules organiques essentielles à la prolifération ($\Delta his/\Delta leu/\Delta met/\Delta ura$ pour BY4742 et $\Delta his/\Delta leu/\Delta lys/\Delta ura$ pour BY4743). Les levures haploïdes ont été cultivées en milieu riche YPD (1% extrait de levure, 2% peptone, 2% glucose (dextrose)) ou en milieu minimal SC (0.6% « Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids », 0.08% mélange d'acides aminés, 2% glucose). Les transformants ont été cultivés sur milieu SC minimal avec sélection auxotrophique (p413ADH contient une cassette *URA* qui permet la survie en absence d'uracile et p415ADH contient une cassette *LEU* qui permet la survie en absence de leucine). La sélection des levures diploïdes s'est fait sur milieu minimal SC avec une sélection auxotrophique appropriée (-lys-met pour les levures diploïdes sauvages, -lys-met-leu-ura pour les levures diploïdes transformées avec p413ADH et p415ADH). Pour toutes les mesures de fluorescence, les levures ont été placées dans un milieu minimal SC à faible fluorescence (5 g/l (NH₄)₂SO₄, 1 g/l KH₂PO₄, 0.5 g/l MgSO₄, 0.1 g/l NaCl, 0.1 g/l Ca₂Cl, 0.5 mg/l H₃BO₄, 0.04 mg/l CuSO₄, 0.1 mg/l KI, 0.2 mg/l FeCl₃, 0.4 mg/l MnSO₄, 0.2 mg/l Na₂MoO₄, 0.4 mg/l ZnSO₄, 2 μ g/l biotine, 0.4 mg/l pantothénate de calcium, 2 mg/l inositol, 0.4 mg/l niacine, 0.2 mg/l PABA, 0.4 mg/l pyridoxine HCl, 0.4 mg/l thiamine) avec la sélection auxotrophique appropriée.

Constructions génétiques

Les enzymes employées pour les constructions génétiques proviennent soit de Fermentas ou de New England Biolabs. Les conditions et les temps de réaction recommandés par le fabriquant ont été suivis. Les gels d'agarose employés (1% agarose) contiennent du Gelstar® (Cambrex). Ce marqueur d'ADN permet de visualiser les bandes sous une lumière bleu qui n'est pas dommageable pour l'ADN. La purification des bandes d'ADN à partir des gels s'est fait en employant le kit QIAEX II™ de Qiagen. L'extraction des plasmides contenus dans les bactéries s'est fait en employant le kit «QIAprep spin miniprep»™ de Qiagen. Les recommandations du fabriquant ont été suivies.

Amplification des fragments 1 et 2 et des versions pleines longueur de la yEGFP, la Citrine, la mCitrine et la Venus

Les plasmides pKT103, pKT140, pKT209 et pKT211, contenant respectivement les séquences codantes pour les versions de la Venus, la Citrine, la yEGFP et la mCitrine optimisées pour l'expression dans la levure sont publiquement disponibles (Sheff *et al.* 2004). Les fragments 1 et 2 de ces protéines, ainsi que leur version pleine longueur, ont été amplifiés par PCR à partir de ces plasmides, en utilisant les oligonucléotides appropriés (voir Tableau I). Ces oligonucléotides ajoutent des sites de restriction aux extrémités 5' et 3' des séquences afin de permettre leur sous-clonage. La moitié du lien peptidique souple (GGGGS) est également ajoutée en 5'. Pour amplifier le fragment 1, les oligonucléotides A et E ont été employés. Pour amplifier le fragment 2, les oligonucléotides B et F ont été employés. Pour amplifier la mCitrine pleine longueur, les oligonucléotides A et F ont été employés. Le kit Accuprime™ Pfx d'Invitrogen, qui emploie l'enzyme Pfx, a été utilisé pour ces amplifications, vu sa haute fidélité. Le protocole suggéré par le fabricant a été employé sans modifications. Le produit des PCR a été placé sur gel d'agarose. La bande de taille appropriée a été découpée du gel, et l'ADN en a été extrait.

Tableau I : Liste des oligonucléotides employés lors des amplifications par PCR de la mCitrine. Les séquences codantes pour les sites de restriction sont soulignées. Les séquences codantes pour les liens peptidiques souples sont en italique. Les séquences d'hybridation au gène cible sont en gras. Les codons STOP ajoutés sont en gras et soulignés. Les séquences permettant aux enzymes de restriction de digérer le produit PCR ajoutées aux extrémités des oligonucléotides (tel que recommandé par le fabricant) n'ont pas de modification de police.

Fragment Identification (orientation)	cible	Séquence (5'→3')	Site de clonage
A	F1 (sens)	GAGAGGGATCCGGAGCGCGTGGCTCT TCTAAAGGTGAAGAATTATTTCAC	BamHI
B	F2 (sens)	GAGAGGGATCCGGAGCGCGTGCTCT AAGAATGTTATCAAGTTAACTTC	BamHI
C	F1 (sens)	CCCGGGTCCGGAGGTGGAGGTTCT TCTAAAGGTGAAGAATTATTTCAC	BspEI
D	F2 (sens)	CCCGGGTCCGGAGGTGGAGGTTCT AAGAATGTTATCAAGTTAACTTC	BspEI
E	F1 (anti-sens)	GCGCGCTCGAGTTATTGTTCTCAGCCATGATGTA	XhoI
F	F2 (anti-sens)	GCGCGCTCGAGTTATTGTACAATTCATCCATAC	XhoI

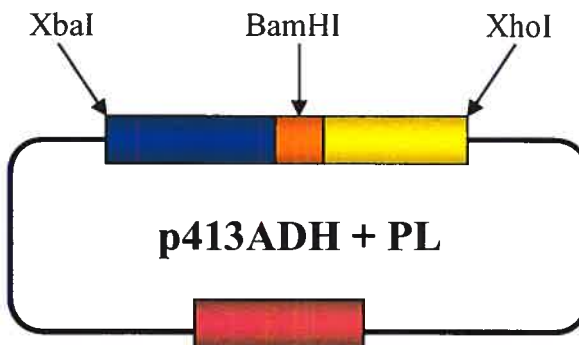
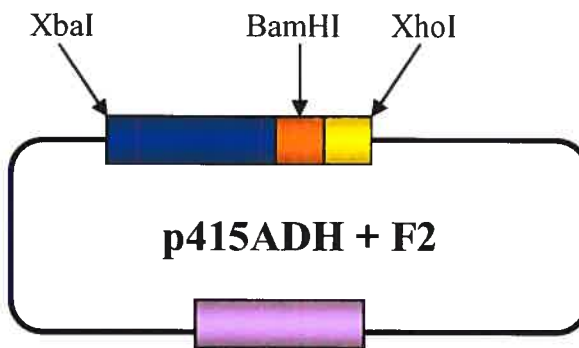
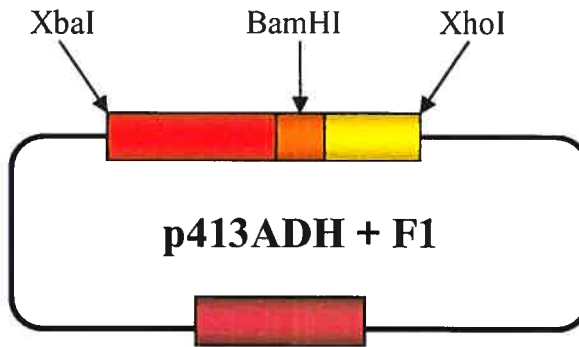
Sous-clonage de yEGFP, Citrine, mCitrine et Venus dans les vecteurs d'expression p413ADH et p415ADH en vue de l'essai de comparaison

Des vecteurs p413ADH et p415ADH (Mumberg *et al.* 1995) contenant respectivement Ras et le RBD de Raf avaient déjà été construits. Les deux protéines étaient insérées en phase avec la moitié du lien peptidique souple (GGGGS), entre les sites de restriction XbaI (en 5') et BamHI (en 3', codant pour GS). Ces plasmides ont été utilisés comme base de construction. Les fragments 1 et 2, ainsi que les versions pleine longueur de la yEGFP, la Citrine, la mCitrine et la Venus ont été digérés avec les enzymes BamHI et XhoI, puis placés sur gel d'agarose. La bande de taille appropriée a été découpée du gel, et l'ADN en a été extrait. Les plasmides p413ADH et p415ADH contenant Ras et le RBD de Raf ont été digérés avec les enzymes de restriction BamHI et XhoI, déphosphorylés avec l'enzyme CIP, puis placés sur gel d'agarose. La bande de taille appropriée a été découpée du gel, et l'ADN en a été extrait. L'enzyme DNA ligase a été employée afin de sous-cloner les fragments 1 des protéines fluorescentes digérés et purifiés dans p415ADH digéré et purifié, les fragments 2 étant sous-clonés dans p413ADH, et les versions pleine longueur dans p415ADH. Les ligations ont été transformées dans des bactéries par électroporation, puis sélectionnées sur des pétris contenant du LB et de l'ampicilline. Les souches positives ont été amplifiées, et les plasmides en ont été extraits. Ces plasmides ont été séquencés afin de vérifier l'absence de mutations spontanées. Les constructions finales sont présentées à la figure 8.

Mutagenèse dirigée sur la Venus

Afin d'obtenir la mVenus, la construction p413ADH contenant le fragment 2 de la Venus a été la cible d'une mutagenèse dirigée. Le kit «QuikChange® site directed mutagenesis» de Stratagene a été employé pour effectuer la mutation A206K sur la construction précédente contenant la Venus. Le protocole suggéré par le fabricant a été employé sans modifications. Le tableau II illustre les oligonucléotides G et H

Figure 8 : Constructions génétiques nécessaires à l'essai de comparaison pour le choix du rapporteur. Ces trois constructions ont été effectuées pour chacune des variantes de la GFP à l'essai: la EGFP, la Citrine, la Venus, la mCitrine et la mVenus. Ces protéines et leurs fragments sont illustrés en jaune. Les sites de restriction utilisés pour les clonages sont indiqués.



Légende

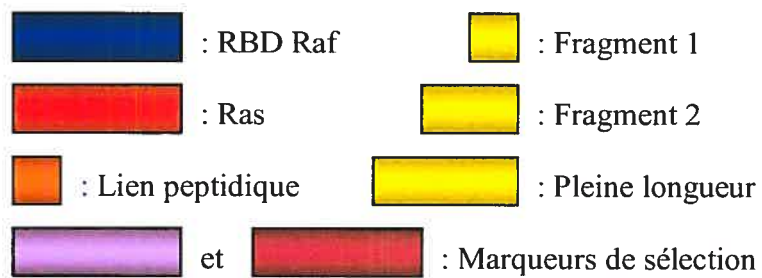


Tableau II : Liste des oligonucléotides employés lors de la mutagenèse de la Venus en mVenus. Le codon induisant la mutation A206K est souligné.

Identification	Orientation	Séquence (5'→3')
G	Sens	GACAACCATTA CT TATCCCTATCAATCTAAGTTATCCAAAGATCCAAACGAAAAGAGA
H	Anti-sens	TCTCTTTTCGTTGGATCTTGGATAACTT AG ATTGATAGGATAAGTAATGGTTGTC

employés pour cette mutagenèse. La construction finale a été séquencée afin de vérifier l'absence de mutations spontanées.

Sous-clonage de la mCitrine et de ses fragments dans les vecteurs d'expression p413ADH et p415ADH en vue de la cartographie

Les précédentes constructions voyaient le site de multiclonage des plasmides p413ADH et p415ADH retiré complètement. Afin de cloner les différents ORFs nécessaires à la cartographie, des sites additionnels devaient être employés. Les plasmides p413ADH et p415ADH originaux, contenant la totalité du site de multiclonage, ont donc été utilisés comme base pour sous-cloner la mCitrine et ses fragments en phase avec les ORFs.

Les fragments de la mCitrine, ainsi que la version pleine longueur, ont été amplifiés par PCR, purifiés et digérés de la même façon que pour l'essai de comparaison. Par contre, en plus du site BamHI codé dans le lien peptidique souple, le site de restriction BspEI (codant pour SG) a été inséré à sa suite, afin de donner plus de possibilités de clonage. Les oligonucléotides ayant été utilisés sont illustrés au Tableau I.. Pour amplifier le fragment 1, les oligonucléotides C et E ont été employés. Pour amplifier le fragment 2, les oligonucléotides D et F ont été employés. Pour amplifier la mCitrine pleine longueur, les oligonucléotides C et F ont été employés. Les plasmides p413ADH et p415ADH originaux ont été digérés à l'aide des enzymes XbaI et XhoI, puis déphosphorylés avec l'enzyme CIP. Les étapes subséquentes de purification, de ligation, de sélection, d'amplification et d'extraction sont les mêmes que pour les constructions de l'essai de comparaison. Le fragment 1 a été sous-cloné dans le vecteur p413ADH, le fragment 2 dans le vecteur p415ADH et la version pleine longueur dans le vecteur p413ADH. Ces constructions intermédiaires ont été séquencées afin de vérifier l'absence de mutations spontanées.

Extraction et amplification des ORFs de la voie HOG à partir du génome de la levure

L'ADN génomique des levures a été extrait en employant la méthode «Bust n'Grab» (Harju *et al.* 2004). Cet ADN a été traité à la RNase et purifié afin de servir de matrice permettant d'amplifier les ORFs de la voie HOG. Des plasmides p413ADH et p415ADH contenant WinZip A et WinZip B ont été utilisés comme matrice pour ces deux ORFs. Le kit Accuprime™ Pfx d'Invitrogen a été employé pour extraire, par PCR, ces ORFs, en suivant les recommandations du fabricant. Les oligonucléotides spécifiques aux ORFs employés pour cette amplification permettent d'insérer, en 5' de l'ORF, le site BcuI ou un site compatible avec BcuI (NheI ou AvrII), et en 3' de l'ORF un site BamHI (ou BglII, qui lui est compatible) ou BspEI (ou AgeI, qui lui est compatible). Les ORFs sont amplifiés en ajoutant des sites qui ne se retrouvent pas dans leur séquence codante. Ces oligonucléotides permettent aussi d'insérer, en 3', la moitié du lien peptidique souple complémentaire à celle se trouvant sur les constructions intermédiaires contenant la mCitrine et ses fragments. Ces oligonucléotides sont illustrés au Tableau III. Le produit des PCR a été placé sur gel d'agarose. La bande de taille appropriée a été découpée du gel, et l'ADN en a été extrait.

Sous-clonage des ORFs de la voie HOG dans les vecteurs d'expression p413ADH et p415ADH contenant la mCitrine ou ses fragments

Les constructions intermédiaires contenant la mCitrine et ses fragments ont été utilisés comme base pour la construction des vecteurs finaux. Les ORFs amplifiés par PCR ont été digérés avec les enzymes appropriées, puis purifiés. Les constructions p413ADH contenant le fragment 1 de la mCitrine ou sa version pleine longueur et p415ADH contenant le fragment 2 de la mCitrine ont été digérées à l'aide des enzymes BcuI et BamHI ou BspEI. Toutes ces digestions ont été déphosphorylées à l'aide de l'enzyme CIP. Le produit des 6 digestions a été placé sur gel, et la bande de taille appropriée a été extraite du gel. Les 8 ORFs (incluant les

Tableau III : Liste des oligonucléotides employés lors des amplifications par PCR des ORFs de la voie HOG. Les séquences codantes pour les sites de restriction sont soulignées. Les séquences codantes pour les liens peptidiques souples sont en italique. Les séquences d'hybridation au gène cible sont en gras. Les séquences permettant aux enzymes de restriction de digérer le produit PCR ajoutées aux extrémités des oligonucléotides (tel que recommandé par le fabricant) n'ont pas de modification de police.

Gène cible	Séquence (5'→3') amorce sens	Séquence (5'→3') amorce anti-sens	Sites de clonage
Cdc24	GAGAGGCTAGC ATGGCGATCCAAACCCGTTTG	GTGTGGATCCGCCACCGCC ATACAGACGAATGTTCAAGAATTTC	NheI/ BamHI
Far1	GAGAGCCTAGG ATGAAGACACCAACAAGAGTTTC	GTGTGTCCGGA/TCGCCACCGCC GAGCTTGCGAACTTCCAGGG	AvrII/ BspEI
Hog1	GAGAGGCTAGC ATGACCACCTAACGAGGAATTCAT	GTGTGACCGGTTCCGCCACCGCC CTGTTGGAATCATTTAGCGTAC	NheI/ AgeI
Pbs2	GAGAGACTAGT ATGGAAGACCAAGTTTGCTAACCCT	GTGTGGGATCCGCCACCGCC TAAACCACCCATATGTAAATGCCG	BcuI/ BamHI
Sho1	GAGAGGCTAGC ATGTCAATATCATCAAGATAAGAC	GTGTGACCGGTTCCGCCACCGCC ACGATGCATTCTTCTGGACCA	NheI/ AgeI
Ssk1	GAGAGGCTAGC ATGCTCAATTCTGCCTTACTGTG	GTGTGACCGGTTCCGCCACCGCC CAATTCTAATTGAGTGCGCGAG	NheI/ AgeI
Ste11	GAGAGGCTAGC ATGGAACAGACACAACAGCAG	GTGTGGGATCCGCCACCGCC AATTATGTGTGCATCCAGCCATG	NheI/ BamHI
Ste12	GAGAGACTAGT ATGAAGTCCAAATAACCAATAGTA	GTGTGAGATCTGCCACCGCC GGTTGCAITCTGGAAGGTTTAT	BcuI/ BgIII
Ste20	GAGAGACTAGT ATGAGCAATGATCCATCTGCTG	GTGTGTCCGGA/TCGCCACCGCC CTTTGTTTATCATCTTCAGTTACG	BcuI/ BspEI
Ypd1	GAGAGGCTAGC ATGTCTACTATTCCTCAGAAATC	GTGTGACCGGTTCCGCCACCGCC TAGCTTGTGTTGTAATATTAGATA	NheI/ AgeI

Zipper de leucine) ayant été amplifiés avec succès ont été combinés aux 3 constructions de vecteurs compatibles, formant ainsi 24 réactions de ligation. Les ligations ont été transformées dans des bactéries par électroporation, puis sélectionnées sur des pétris contenant du LB et de l'ampicilline. Les souches positives ont été amplifiées, et les plasmides en ont été extraits. L'insertion appropriée des ORFs a été diagnostiquée par patron de digestion. Les constructions finales sont présentées à la figure 9.

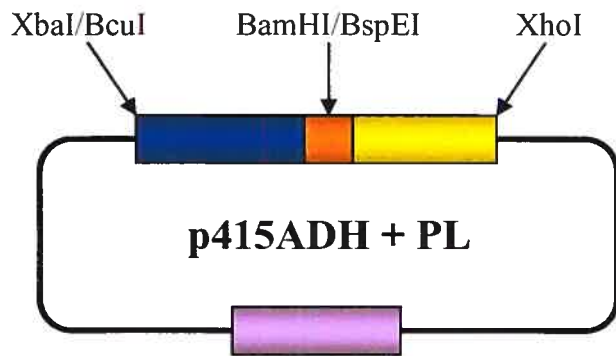
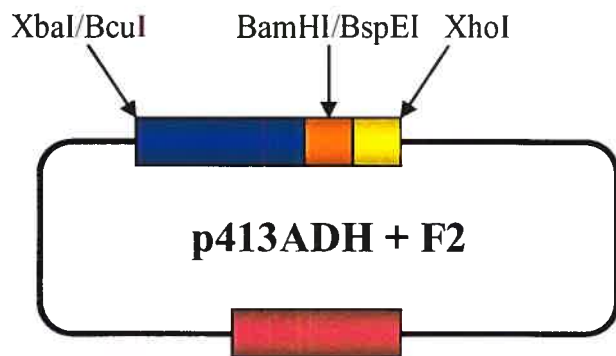
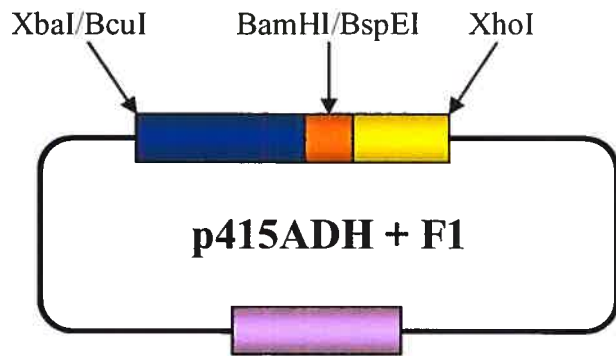
Transformations dans les levures et accouplement

Les plasmides p413ADH et p415ADH ont été transformés dans les levures haploïdes en utilisant la méthode de haute efficacité (Gietz *et al.* 2002). Les transformations ont été étalées sur des pétris contenant du milieu SC avec les sélections auxotrophiques appropriées. Pour les essais PCA, les colonies haploïdes transformées avec p413ADH ou p415ADH ont été accouplées en inoculant du milieu YPD avec une souche *Mata* et une souche *Mat α* , puis en laissant les levures s'accoupler toute la nuit à 30°C avec agitation. Ces milieux ont ensuite été étalés dans des pétris contenant du milieu SC sélectionnant pour des levures diploïdes contenant à la fois p413ADH et p415ADH. Les colonies positives ont été conservées sur pétri à 4°C et employées pour les essais subséquents.

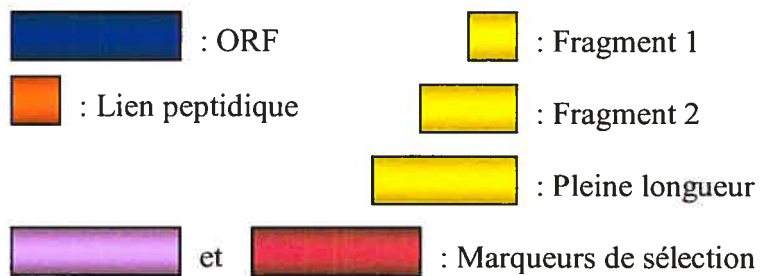
Mesures de fluorescence

Pour tous les essais de mesure, un milieu SC à faible fluorescence contenant la sélection auxotrophique appropriée a été inoculé avec les souches de levures nécessaires à l'essai. Les tubes d'inoculation ont été placés à 30°C avec agitation toute la nuit afin d'amener la culture à saturation. Le lendemain, du milieu SC à faible fluorescence contenant la sélection auxotrophique appropriée a été inoculé avec les cultures parvenues à saturation, de façon à ce que le nombre de cellules servant à l'inoculation permette d'atteindre une croissance exponentielle après 5hr à

Figure 9 : Constructions génétiques nécessaires aux essais de cartographie. Ces trois constructions ont été effectuées pour chacun des ORFs et pour les zippers de leucine. La mCitrine pleine longueur ainsi que ses fragments sont illustrés en jaune. Les sites de restriction utilisés pour les clonages sont indiqués.



Légende



30°C avec agitation. L'état de croissance a été évalué en mesurant la densité optique à 600nm.

Essais PCA par microscopie

Les levures parvenues à croissance exponentielle ont été laissées dans leur milieu SC à faible fluorescence puis placées sur des lamelles traitées à la concanavaline A. Cette protéine lie les sucres présents à la membrane des levures et leur permet d'adhérer aux lamelles. Les levures ont été observées sur un microscope inversé Nikon TE2000U à 100X. L'acquisition des images s'est fait à l'aide du logiciel Métamorph de Universal Imaging Corporation (version 6.2). Une lampe au mercure HBO103 de Osram et les filtres GFP (41001) et YFP (41028) de Chroma ont permis l'acquisition des images par fluorescence. Chaque champ a été acquis par contraste de phase puis immédiatement après par fluorescence.

Quantification des images de microscopie

Les images prises par contraste de phase ont été utilisées pour créer un masque délimitant les régions occupées par des levures à l'aide du logiciel Adobe Photoshop CS. Pour ce masque, les cellules ont été manuellement sélectionnées grâce à l'outil lasso, puis la sélection a été remplie de noir. Un programme a été écrit à l'aide du logiciel MATLAB et sa boîte à outil permettant le traitement d'images. L'algorithme utilisé est le suivant: l'image prise par fluorescence est chargée par le programme, le masque correspondant est appliqué à l'image, la valeur des pixels sous le masque (région en noir) est emmagasinée dans un vecteur P et un histogramme contenant les valeurs des vecteurs P est généré. Le programme fournit la fluorescence moyenne des pixels sous le masque et la fluorescence totale de l'image sous le masque. Le tout est disposé dans une matrice, qui est importée dans le logiciel Microsoft Excel. Trois champs complets ont été quantifiés pour chaque construction

Essais PCA par FACS

Les levures parvenues à croissance exponentielle ont été laissées dans leur milieu SC à faible fluorescence, puis mesurées par FACS. Un appareil FACSCalibur a été utilisé pour mesurer la fluorescence émise par les levures (filtre FITC). Les logiciels Cellquest et Cellquest Pro ont été utilisés pour traiter les données avec les paramètres suivants: pour F11 530nm \pm 15nm, pour F12 580nm \pm 15nm. La valeur moyenne de 10 000 événements a été employée pour la comparaison entre les différents fluorophores.

Cartographie statique sur lecteur de plaques

Les levures parvenues à croissance exponentielle ont été laissées dans leur milieu SC à faible fluorescence, puis placées sur des plaques Corning 96 puits à raison de 200 μ l par puit. Du milieu SC à faible fluorescence a été utilisé comme blanc. Des mesures de densité optique à 600nm pour chaque plaque ont été prises sur un lecteur de plaques Spectramax 190 à l'aide du logiciel Softmax Pro (version 4.8). Des mesures de fluorescence ont été prises sur un lecteur de plaques Gemini XS à l'aide du même logiciel. Les longueurs d'onde d'excitation (485nm) et d'émission (535nm) ont été choisies puisqu'elles permettent un ratio signal/bruit supérieur. La valeur de fluorescence a été divisée par la valeur de densité optique afin de normaliser la fluorescence au nombre de cellules. La relation entre fluorescence et densité optique est linéaire pour les valeurs de densité optique utilisées (données non illustrées). Trois plaques indépendantes ont été mesurées séparément.

Observations de la dynamique de localisation par microscopie

Les levures parvenues à croissance exponentielle ont été laissées dans leur milieu SC à faible fluorescence, puis placées dans une chambre d'observation, sur des

lamelles traitées à la concanavoline A. La quantité appropriée de KCl 5M a été ajoutée à la chambre afin de provoquer un choc osmotique (concentration finale 1M KCl). Les images ont été acquises sur le même microscope que pour les essais PCA, avec les mêmes réglages. Pour chaque champ, une image en contraste de phase et une image par fluorescence ont été prises avant le choc, puis des images par fluorescence ont été prises à chaque 2 minutes durant 30 minutes.

Cartographie dynamique sur lecteur de plaques

Les levures parvenues à croissance exponentielle ont été laissées dans leur milieu SC à faible fluorescence, puis placées sur des plaques Corning 96 puits à raison de 200µl par puit. Du milieu SC à faible fluorescence a été utilisé comme blanc. La densité optique à 600nm a été utilisée pour normaliser les valeurs de fluorescence. La quantité appropriée de KCl 5M a été ajoutée simultanément aux puits afin de provoquer un choc osmotique (concentrations finales allant de 0.5M KCl à 1.5M KCl). La fluorescence a été mesurée à intervalles réguliers (toutes les deux minutes).

Résultats

Choix d'un système d'expression

Puisque le système d'expression basé sur la recombinaison homologue et l'expression sous contrôle du promoteur endogène perturbe le moins possible le système de voies de signalisation à étudier, nous nous sommes demandé si cette méthode d'expression permettait une détection des interactions, ou si le niveau d'expression endogène serait insuffisant pour permettre au signal provenant de rapporteurs reconstitués de surpasser le niveau d'autofluorescence des levures. Afin de vérifier cette hypothèse, trois cassettes de recombinaison homologue ont été construites. La première contient un lien peptidique souple de 10 acides aminés (GGGGSGGGGS) placé en phase avec la séquence codante pour la Venus pleine longueur, qui était alors le meilleur fluorophore à notre disposition. Cette cassette permet de marquer les protéines d'intérêt avec une protéine Venus pleine longueur capable de rapporter la localisation et l'expression du gène d'intérêt. Les deux autres cassettes contiennent le même lien peptidique souple en phase avec soit la séquence codant pour le fragment 1 de la Venus ou le fragments 2 de la Venus. Ces cassettes permettent d'effectuer un essai PCA par fluorescence en marquant deux protéines d'intérêt avec les fragments 1 et 2 de la Venus.

Des gènes de la voie HOG ont été choisis afin de vérifier notre hypothèse. Nous avons inséré les cassettes sur le génome, en phase avec les ORFs choisis, puis diagnostiqué les colonies positives pour vérifier la présence de l'insert en 3' du gène d'intérêt. Malheureusement, lors de l'essai par microscopie, aucun signal significatif n'a pu être détecté dans les essais PCA (données non présentées). Par contre, il a été possible de détecter faiblement certains gènes de la voie marqués avec la protéine Venus pleine longueur. Comme le signal PCA était insuffisant pour permettre la détection, nous avons choisi d'effectuer nos essais en utilisant une autre méthode pour exprimer les protéines de fusion.

Choix du rapporteur

À la lumière des publications comparant différentes variantes de la GFP et la YFP (voir introduction), nous avons décidé de comparer le signal PCA provenant des variantes les plus prometteuses afin de déterminer laquelle de ces variantes émettait un signal PCA maximal. Trois protéines ont été choisies pour la comparaison : la Citrine, la Venus et la yEGFP. La mCitrine, une variante de la Citrine qui s'en distingue par une mutation abrogeant sa propension à dimériser, a aussi été mise à notre disposition pour fins de comparaison. La séquence codante pour ces quatre protéines pleine longueur a été sous-clonée dans des vecteurs p415ADH, en phase avec la séquence codante pour Ras, unis par un lien peptidique souple de 10 acides aminés (GGGGSGGGGS). Ces constructions permettent d'exprimer, sous contrôle du promoteur constitutif ADH, la protéine Ras fusionnée à la version pleine longueur des protéines rapporteuses, permettant d'évaluer la fluorescence relative de chacune des variantes. La séquence codante pour les fragments 1 et 2 des quatre rapporteurs a aussi été sous-clonée dans des vecteurs d'expression p415ADH et p413ADH respectivement. Elles ont été placées en phase avec la séquence codante pour Ras (sur p413ADH) et le RBD de Raf (sur p415ADH), unis par le même lien peptidique souple de 10 acides aminés. Toutes les constructions ont été séquencées pour vérifier l'absence de mutations spontanées. En vue de l'essai PCA, ces deux constructions ont été transformées dans les levures haploïdes *Mata* (pour p413ADH) et *Mata α* (pour p415ADH). Ces levures ont été placées sur un milieu sélectif correspondant à la sélection auxotrophique présente sur les vecteurs d'expression. Les levures sélectionnées ont été accouplées, puis placées sur un milieu sélectionnant pour les levures diploïdes ayant incorporé les deux plasmides.

Nous avons choisi de comparer la fluorescence des différents rapporteurs par microscopie et par FACS. Les résultats sont présentés aux figures 10 et 11. Il faut noter que pour nos mesures en microscopie et en FACS, des filtres optimisés pour les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la GFP ont été utilisés, ce qui défavorise la mCitrine, la Citrine et la Venus légèrement. Ces dernières sont des

Figure 10 : Comparaison du signal de fluorescence des différentes variantes de la GFP et la YFP (pleine longueur et PCA) fusionnées du côté C-terminal des protéines d'intérêt et exprimées à partir des vecteurs d'expression p413ADH et p415ADH, tel que mesuré par FACS et par microscopie. **A)** Comparaison par FACS. Les valeurs d'unités relatives de fluorescence (URF) pour Ras fusionnée aux rapporteurs pleine longueur sont en vert. Les valeurs d'URF pour le PCA Ras-Raf RBD sont en jaune. La valeur d'URF pour l'autofluorescence provenant de levures haploïde *Mata* sauvage est en gris. **B)** Comparaison par microscopie. Le signal de plusieurs cellules (trois champs de microscopie complets) a été quantifié et est rapporté en unités relatives de fluorescence. Les couleurs et la terminologie sont les mêmes qu'en A).

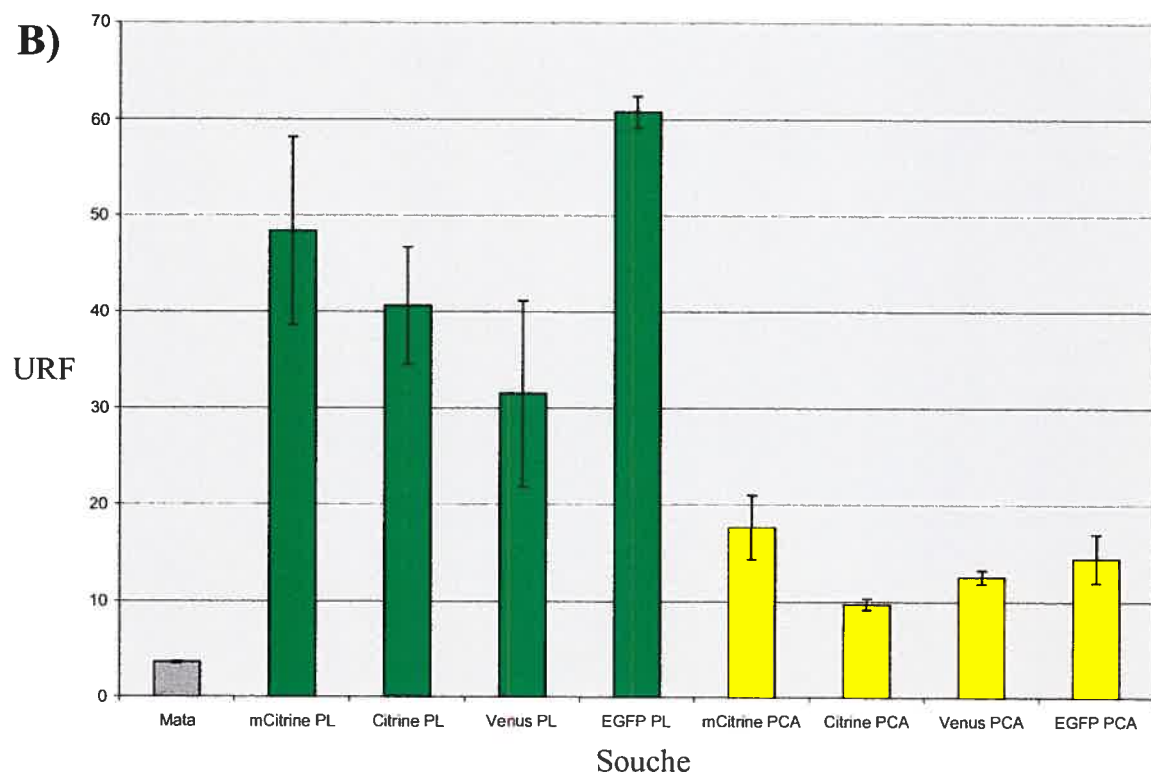
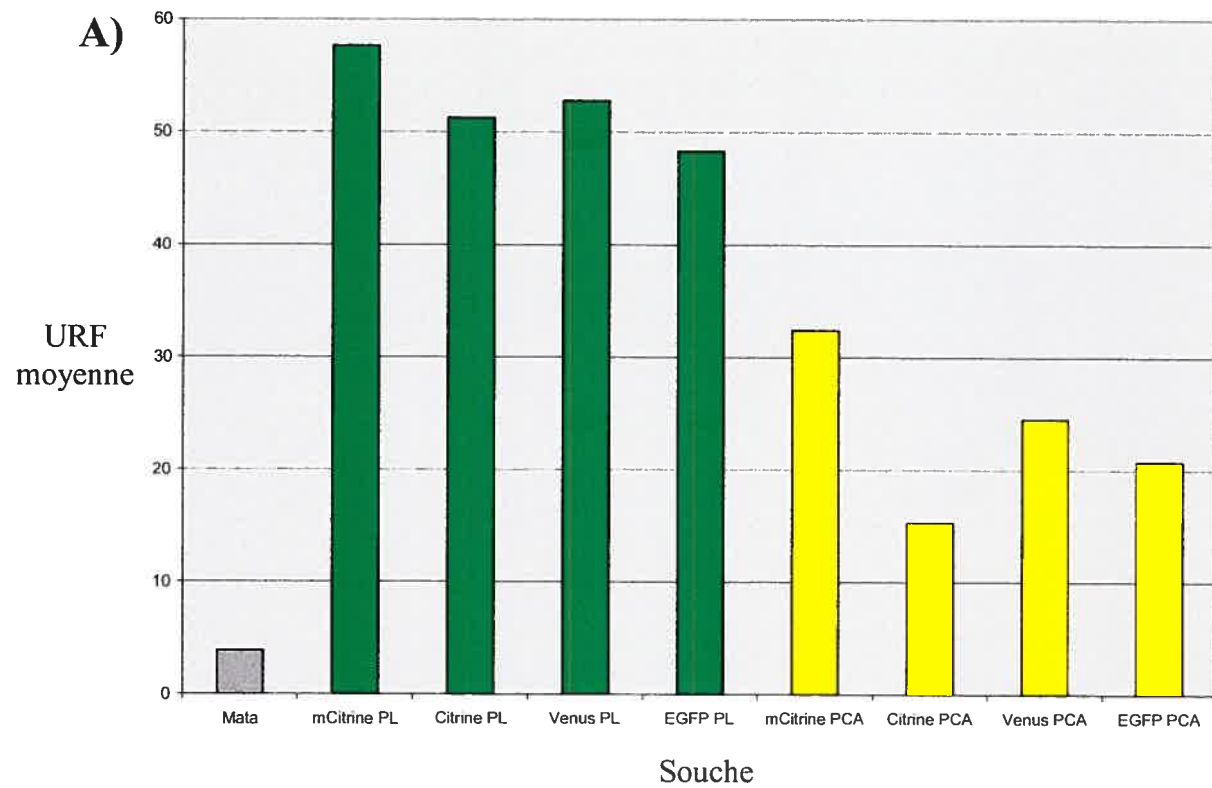
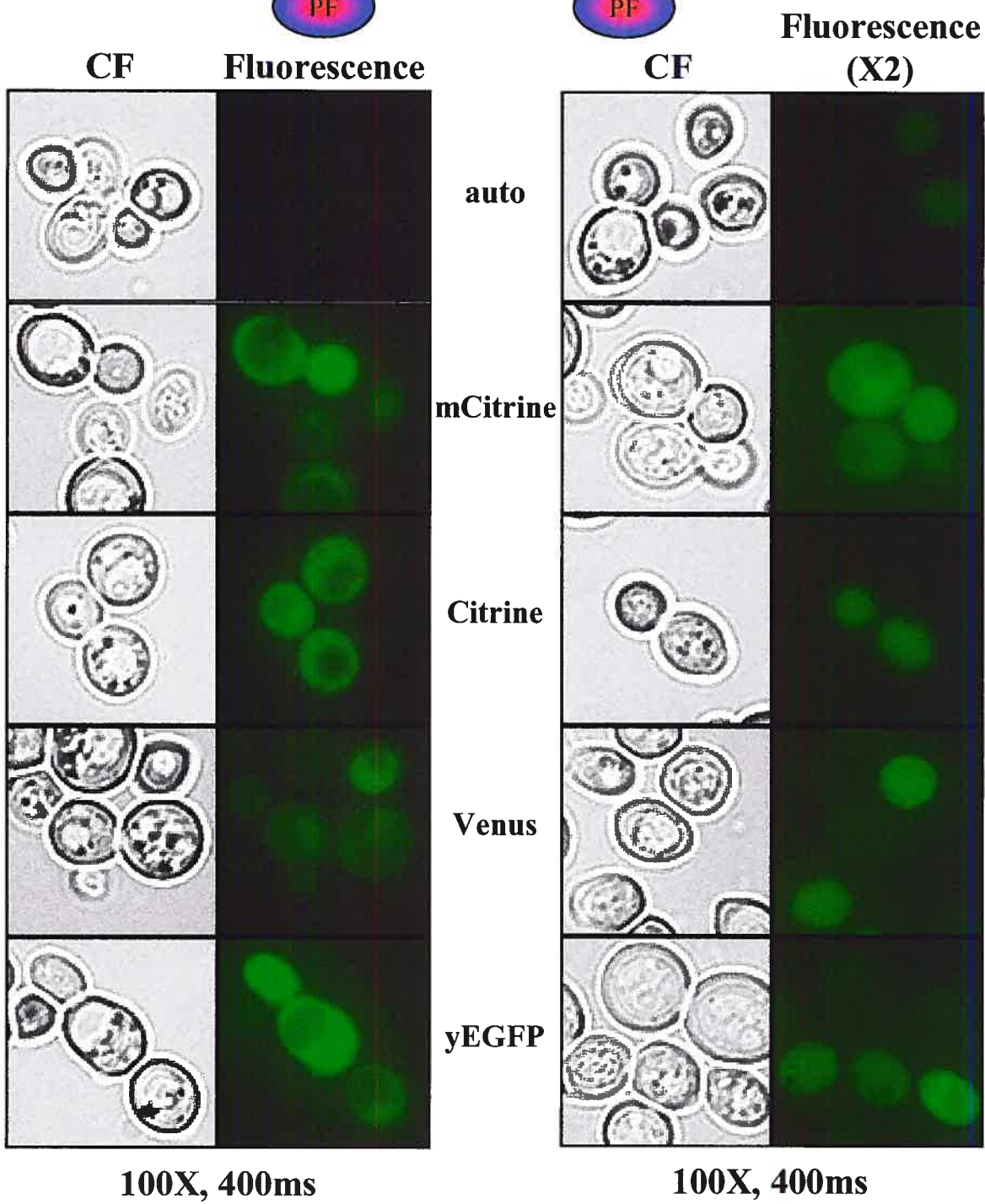
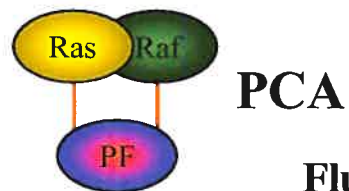
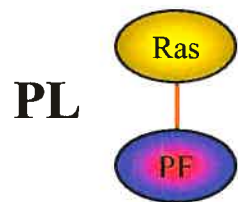


Figure 11 : Souches de levures transformées avec des vecteurs exprimant diverses constructions. La colonne de gauche représente les souches de levure haploïdes exprimant Ras fusionnée à son C-terminal par des protéines fluorescentes pleine longueur . Des levures haploïdes sauvages sont utilisées pour évaluer le bruit de fond. La colonne de droite représente les souches de levure diploïdes exprimant Ras et le RBD de Raf dont le côté C-terminal est fusionné respectivement aux fragments 1 et 2 des protéines fluorescentes (PCA). Des levures diploïdes sauvages sont utilisées pour évaluer l'autofluorescence (auto). Pour chaque colonne, le même champ est produit en contraste de phase (CF) et en fluorescence. Les images de fluorescence des PCA ont été amplifiées de deux fois afin de permettre une meilleure visualisation. Le grossissement (100X) et le temps d'exposition (400ms) est identique pour chaque image. Un petit diagramme indique la composition des protéines de fusion, incluant Ras, le RBD de Raf, le lien peptidique souple (en orange) et la protéine fluorescente (PF)



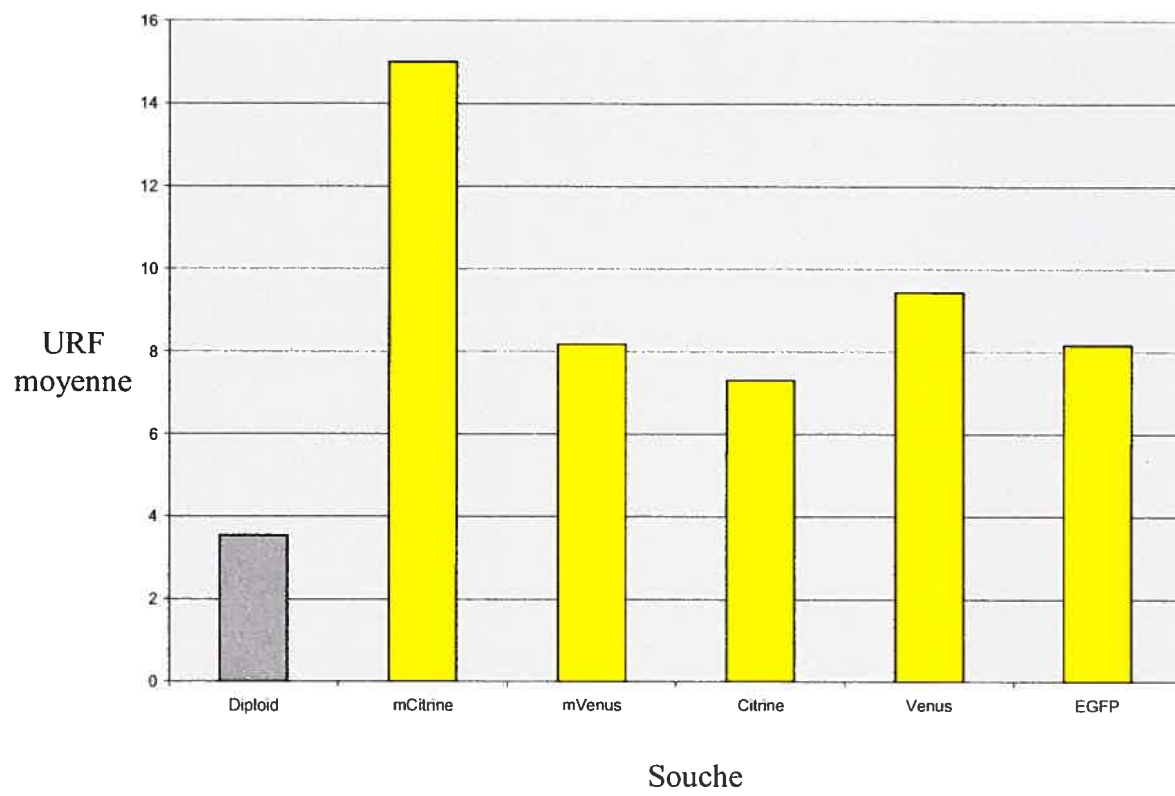
variantes de la YFP dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont légèrement supérieures à celles de la GFP. Néanmoins, les deux approches nous confirment que le PCA mCitrine procure un signal maximal. L'utilisation de filtres optimisés pour la YFP ne ferait que creuser l'écart entre les variantes YFP et la yEGFP.

Les quatre variantes comparées avaient été mises à la disposition de la communauté scientifique sous forme de plasmides (Sheff *et al.* 2004). Toutefois, une variante de la Venus comportant une mutation A206R abrogeant sa dimérisation (la mVenus) n'était pas disponible. Comme nous avons noté une différence significative entre la mCitrine et la Citrine, nous avons décidé de produire la mVenus par mutagenèse dirigée sur la Venus afin de comparer son signal PCA aux autres variantes. Des constructions similaires à celles produites pour les autres variantes des protéines rapporteuses ont été produites pour la mVenus. Ces constructions ont été séquencées, puis transformées de la même façon que les autres constructions. Les résultats sont illustrés à la figure 12. Cet essai a permis de confirmer que la mCitrine était le mutant produisant le signal PCA maximal, à 4.25X au dessus de l'autofluorescence des levures. Contrairement à la mCitrine, la mutation A206R ne semble pas procurer d'avantage à la mVenus. En conséquence, nous avons choisi la mCitrine pour nos essais.

Cartographie statique de la voie HOG

Afin d'établir le bon fonctionnement de l'essai PCA avec des ORFs provenant de la levure, nous avons choisi de cartographier la voie HOG dans son état statique, sans stimulation. Cette cartographie a pour but de vérifier la fiabilité des interactions rapportées par le PCA en les comparant aux interactions rapportées dans la littérature par d'autres techniques. Pour ce faire, nous avons choisi huit protéines de la voie HOG (Cdc24, Hog1p, Pbs2p, Sho1p, Ssk1p, Ste11p, Ste20p et Ypd1p) ainsi que deux autres protéines (Far1p et Ste12p), des récepteurs nucléaires de la voie de réponse aux phéromones présents dans le noyau (Bardwell 2004). Nous avons choisi

Figure 12 : Comparaison entre le signal PCA de différentes variantes de protéines fluorescentes dont les fragments 1 et 2 sont fusionnés respectivement à Ras et au RBD de Raf et exprimés à partir des vecteurs p413ADH et p415ADH, tel que mesuré par FACS. Cette comparaison inclut la mVenus. Ici, la souche sauvage utilisée comme contrôle de bruit de fond (en gris) est une souche diploïde, de même type que celles utilisées pour l'essai PCA.



d'inclure ces deux dernières protéines dans le but d'avoir un contrôle négatif interne, aucune interaction n'étant rapportée entre ces deux protéines et les protéines de la voie HOG. Un contrôle positif était également nécessaire. Les zippers de leucine WinZipA et WinZipB ont donc été ajoutés aux dix gènes choisis. Ces deux domaines, qui se replient sous forme d'hélice α , ont une propension forte à s'hétérodimériser et une faible propension à homodimériser, contrairement à la majorité des Zippers de leucine qui peuvent homodimériser (Arndt *et al.* 2000, Pelletier *et al.* 1999). Cette caractéristique présente un avantage pour l'essai PCA. Dans le cas des homodimères, la population est répartie en dimères rattachés tous deux au fragment 1, au fragment deux, ou aux deux fragments différents du rapporteur, et seule cette dernière possibilité produit un signal PCA. Comme les hétérodimères sont fusionnés à un des deux fragments respectifs du rapporteur, leur interaction rapproche nécessairement une paire de fragments permettant de reconstituer le rapporteur. En ce sens, les Zippers de leucine WinZip A et B sont de meilleurs contrôles positifs puisqu'ils permettent de favoriser les interactions permettant de reconstituer un rapporteur.

Des dix gènes de la levure, seuls Cdc24p, Hog1p, Pbs2p, Sho1p, Ste20p, et Ypd1p ont pu être amplifiés du génome par PCR et sous-clonés avec succès dans les vecteurs d'expression pour l'essai PCA (p413ADH et p415ADH contenant les fragments 1 et 2 de la mCitrine). La taille considérable de certains ORFs, la structure de la chromatine environnante, ainsi qu'un manque de temps, peuvent expliquer pourquoi certains ORFs n'ont pu être sous-clonés et ont dû être abandonnés. Les constructions complétées ont été transformées dans les levures haploïdes (*Mata* pour p413ADH et *Mata α* pour p415ADH). Ces souches de levures ont par la suite été accouplées pour former les différentes souches diploïdes nécessaires aux essais de cartographie. Seule la souche exprimant la combinaison Cdc24p-F1/Ypd1p-F2 n'a pu être produite lors de l'accouplement. La cartographie statique des composantes de la voie HOG a été effectuée à l'aide d'un lecteur de plaques de 96 puits. Les résultats de cette cartographie sont présentés aux figures 13 et 14.

Figure 13 : Cartographie statique des composantes sous-clonées de la voie HOG sur lecteur de plaques. Ce graphique illustre la fluorescence émise par les souches diploïdes exprimant les diverses combinaisons de deux protéines d'intérêt fusionnées aux fragments 1 et 2 de la mCitrine. Ces résultats proviennent de trois plaques différentes. Les diverses combinaisons de protéines d'intérêt sont indiquées en abscisse, le premier ORF étant fusionné au fragment 1 et le second au fragment 2 de la mCitrine. L'axe des ordonnées indique la valeur d'URF normalisée à la densité optique (de Nadal *et al.*). Le trait rouge horizontal indique le seuil choisi pour discriminer les interactions potentielles. Le trait vert horizontal indique le second seuil, au dessus duquel les interactions ont plus de chance d'être valides. La valeur de la souche diploïde utilisée pour évaluer le bruit de fond est en gris.

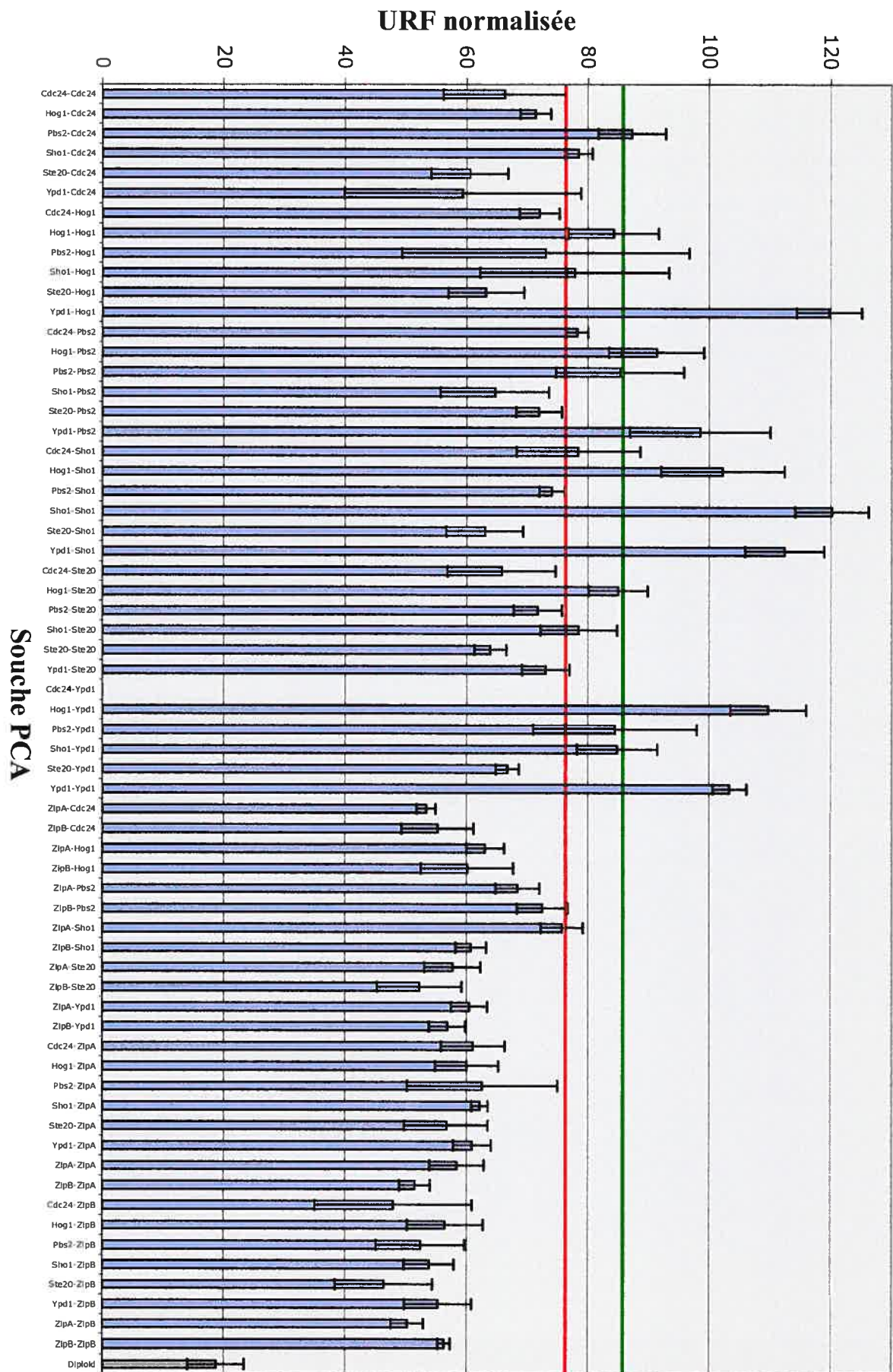


Figure 14 : Représentation graphique des résultats présentés à la figure 10. Les valeurs d'URF normalisées ont été rapportées sur un gradient allant du noir absolu au rouge absolu, la valeur du bruit de fond provenant des levures diploïdes étant rapportée au noir, et celle du plus fort signal PCA rapportée au rouge. En ordonnée, on retrouve, en ordre alphabétique, les ORFs fusionnés au fragment 1 de la mCitrine. En abscisse se trouvent les ORFs fusionnés au fragment 2 de la mCitrine. La diagonale représente le signal émis par les dimères. La combinaison Cdc24-Ypd1 étant non disponible, le rectangle correspondant est en gris.

Plusieurs signaux PCA se démarquent du lot, certaines interactions émettant un signal de fluorescence jusqu'à 6.25X au dessus du bruit de fond des souches diploïdes sauvages. Il est à noter que les contrôles positifs WinZipA contre WinZipB ou WinZipB contre WinZipA ne produisent pas le signal positif attendu. Comme les deux contrôles négatifs internes Far1p et Ste12p n'ont pu être sous-clonés, les valeurs inférieures de la cartographie ont été employées comme contrôles négatifs par défaut, bien que ceux-ci ne constituent pas de véritables contrôles négatifs.

Comme il n'y a pas de distinction franche entre les signaux présumés positifs et les signaux négatifs, un seuil a dû être établi afin de permettre de les différencier. Pour établir ce seuil, les 15 signaux PCA les plus faibles provenant de combinaisons d'ORFs de la voie HOG ont été employés. Comme il est peu probable que toutes les composantes de la voie HOG interagissent entre elles d'une façon ou d'une autre, il est raisonnable d'assumer que les signaux les plus bas provenant de la cartographie soient théoriquement des contrôles négatifs. En prenant la valeur moyenne des 15 plus faibles signaux PCA (pratiquement la moitié des combinaisons), et en y ajoutant deux fois l'écart type de ces valeurs, il a été possible d'établir un premier seuil au dessus duquel il est envisageable de retrouver des positifs. En prenant la même moyenne, mais en y ajoutant quatre fois l'écart type, on obtient un seuil au dessus duquel il est raisonnable d'assumer que les signaux proviennent d'interactions valides.

Sur les 35 combinaisons possibles entre les 6 ORFs de la voie HOG ayant été mesurées, 19 combinaisons ont procuré un signal PCA positif potentiel, au dessus du premier seuil. Les 19 combinaisons représentent 13 interactions potentielles dont 10 sont détectées dans les deux permutations possibles (protéine d'intérêt A fusionnée au fragment 1 contre protéine d'intérêt B fusionnée au fragment 2 et protéine d'intérêt A fusionnée au fragment 2 contre protéine d'intérêt B fusionnée au fragment 1). Neuf de ces combinaisons se retrouvent également au dessus du second seuil, et il est plus raisonnable d'assumer celles-ci comme positives. De ces

neufs interactions, seules trois se retrouvent dans les deux permutations possibles. Trois cartes d'interaction ont été construites à l'aide du logiciel Osprey (GRID), la première représentant les interactions rapportées dans la littérature, la seconde représentant les interactions potentielles détectées par PCA, et la troisième représentant les interactions au dessus du second seuil. Ces cartes sont illustrées à la figure 15. Des 5 interactions rapportées par la littérature, seule celle entre Pbs2p et Sho1p ne se retrouve pas au dessus du premier seuil, de manière symétrique ou asymétrique. Par contre, les quatre interactions de la littérature révélées par le premier seuil se retrouvent également au dessus du second seuil.

Observation dynamique de localisation

Les ORFs ayant été amplifiés par PCR à partir du génome ont également été utilisés pour être fusionnés, à leur C-terminal, au rapporteur mCitrine pleine longueur, le tout sur les vecteurs d'expression p413ADH. Ces constructions avaient pour but d'observer la localisation des protéines d'intérêt et de vérifier qu'elles se comportaient comme les protéines sauvages lors de perturbations de la voie. Des ORFs amplifiées, seuls Hog1p, Sho1p et Ypd1p ont été sous-clonés avec succès. Ces constructions ont été transformées dans des levures haploïdes *Mata*, puis observées par microscopie. Des images prises avec ou sans perturbation (1M KCl) ont été faites. La figure 16 présente ces observations.

Les quelques ORFs observés permettent de constater que le comportement des protéines surexprimées en réponse au choc osmotique est similaire à celui prédit dans la littérature. En effet, Hog1p transite vers le noyau en quelques minutes, une faible proportion demeurant dans le cytoplasme. Sho1p, quand à elle, se retrouve aux sites de croissance polarisée à la membrane, et le choc osmotique ne semble pas perturber sa localisation. Enfin, Ypd1p demeure cytoplasmique, en absence ou en présence de choc osmotique.

Figure 15 : Comparaison entre les interactions rapportées par la littérature et celles détectées par PCA pour les composantes de la voie HOG. **A)** Carte des interactions rapportées par la littérature, en date du 20 décembre 2005 (GRID). Chaque nœud représente un ORF. La couleur des nœuds représente la fonction biologique de chacune des protéines d'intérêt (voir GRID). Chaque flèche symbolise une interaction rapportée. La couleur des flèches indique la méthode expérimentale ayant permis d'établir cette interaction. Une flèche circulaire indique la dimérisation. **B)** Carte des interactions potentielles tel qu'établie dans l'essai PCA de cartographie statique de la voie HOG. La couleur des nœuds représente la fonction biologique de l'ORF. La couleur des flèches indique si l'interaction a été détectée pour les deux permutations possibles (en bleu) ou pour une seule des deux permutations (en rouge). Les interactions correspondent aux signaux PCA supérieurs au premier seuil de la figure 13 (ligne rouge). **C)** Carte des interactions valides tel qu'établie dans l'essai PCA de cartographie statique de la voie HOG. La couleur des nœuds représente la fonction biologique de l'ORF. La couleur des flèches indique si l'interaction a été détectée pour les deux permutations possibles (en bleu) ou pour une seule des deux permutations (en rouge). Les interactions correspondent aux signaux PCA supérieurs au second seuil de la figure 13 (ligne verte).

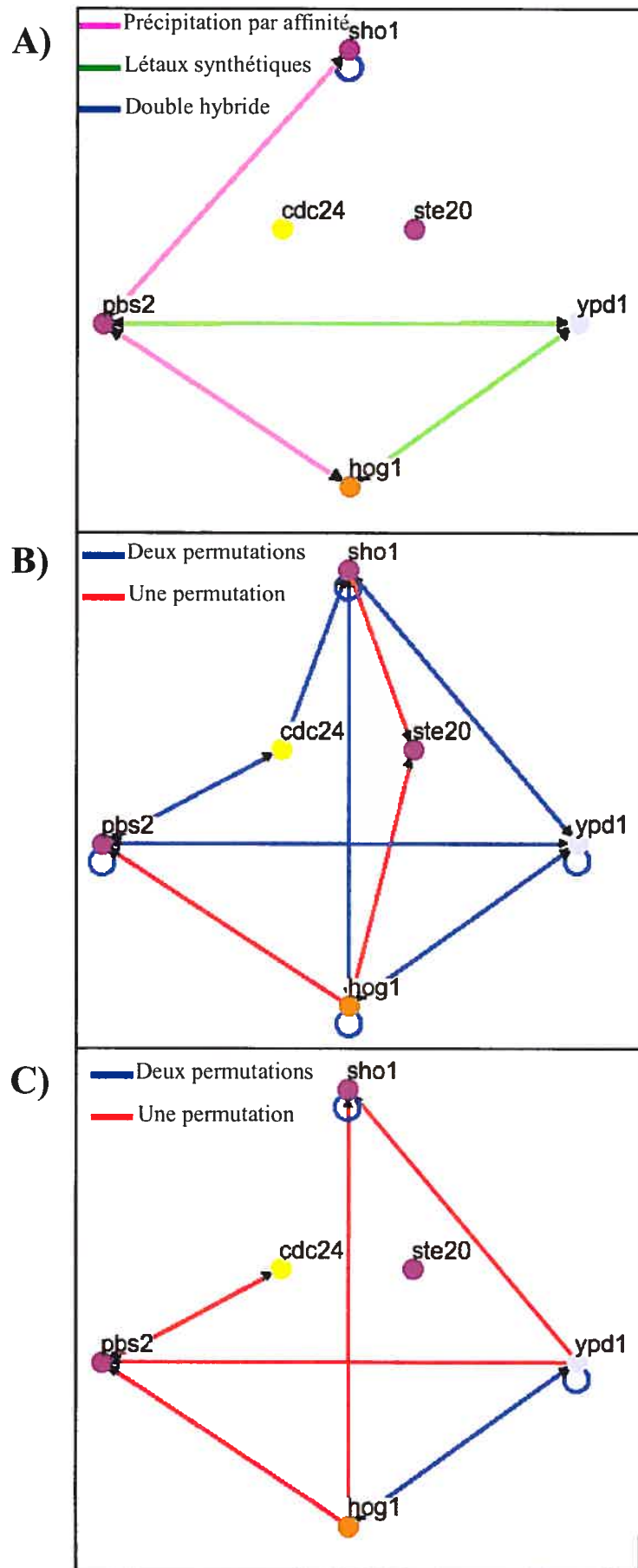
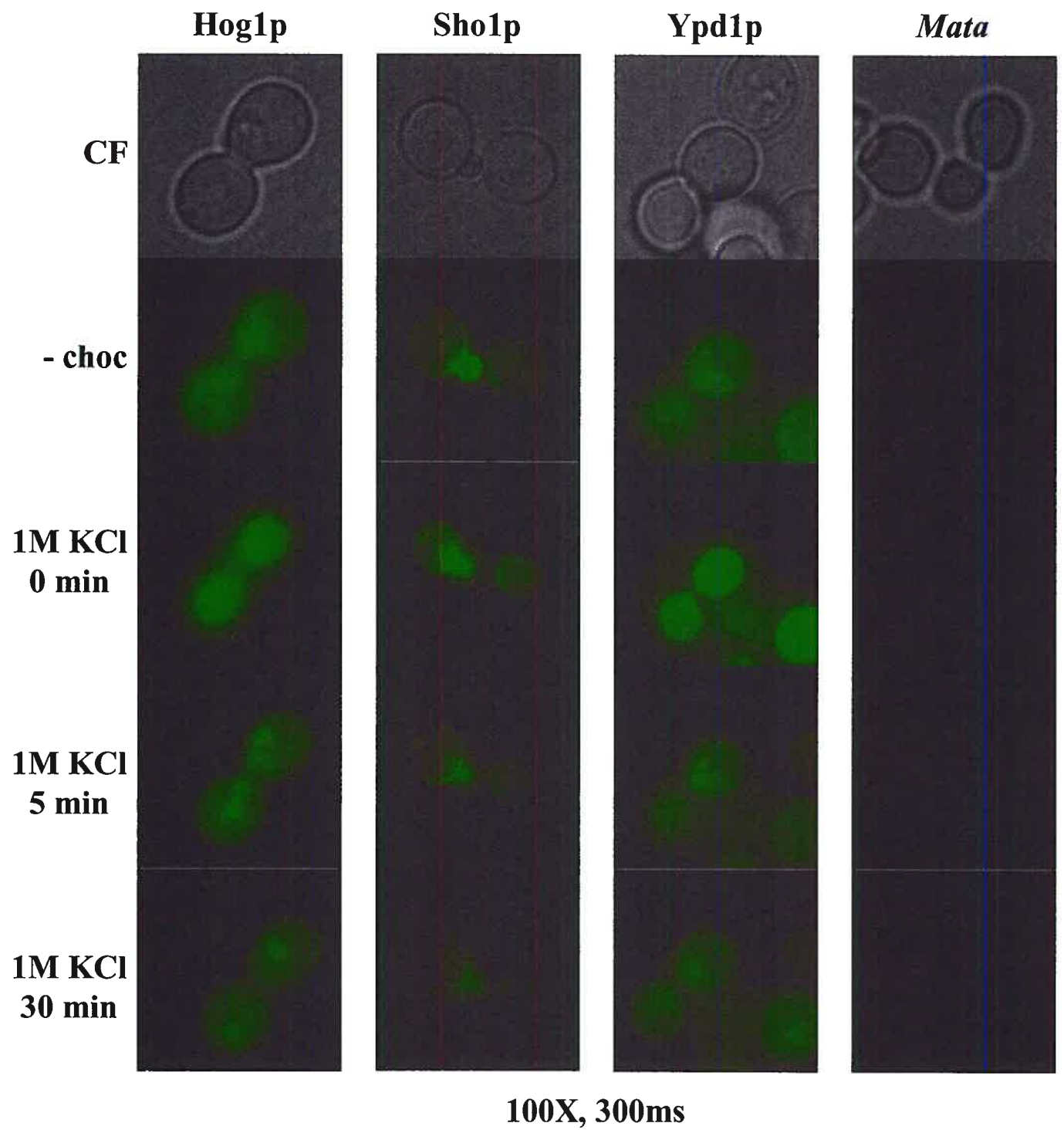


Figure 16 : Dynamique de localisation de composantes de la voie HOG fusionnées, au C-terminal, avec la mCitrine pleine longueur. Chaque colonne représente une souche de levure transformée avec un vecteur exprimant l'ORF indiqué fusionné à la mCitrine pleine longueur. La colonne de droite comporte des levures haploïdes de type *Mata* sauvage, et constitue le contrôle de bruit de fonds. Les levures ont été placées dans un chambre d'observation et photographiées en absence de choc osmotique (- choc) ou à différents temps après un choc osmotique (1M KCl). Le grossissement est de 100X et les images ont été exposées pour 300ms.



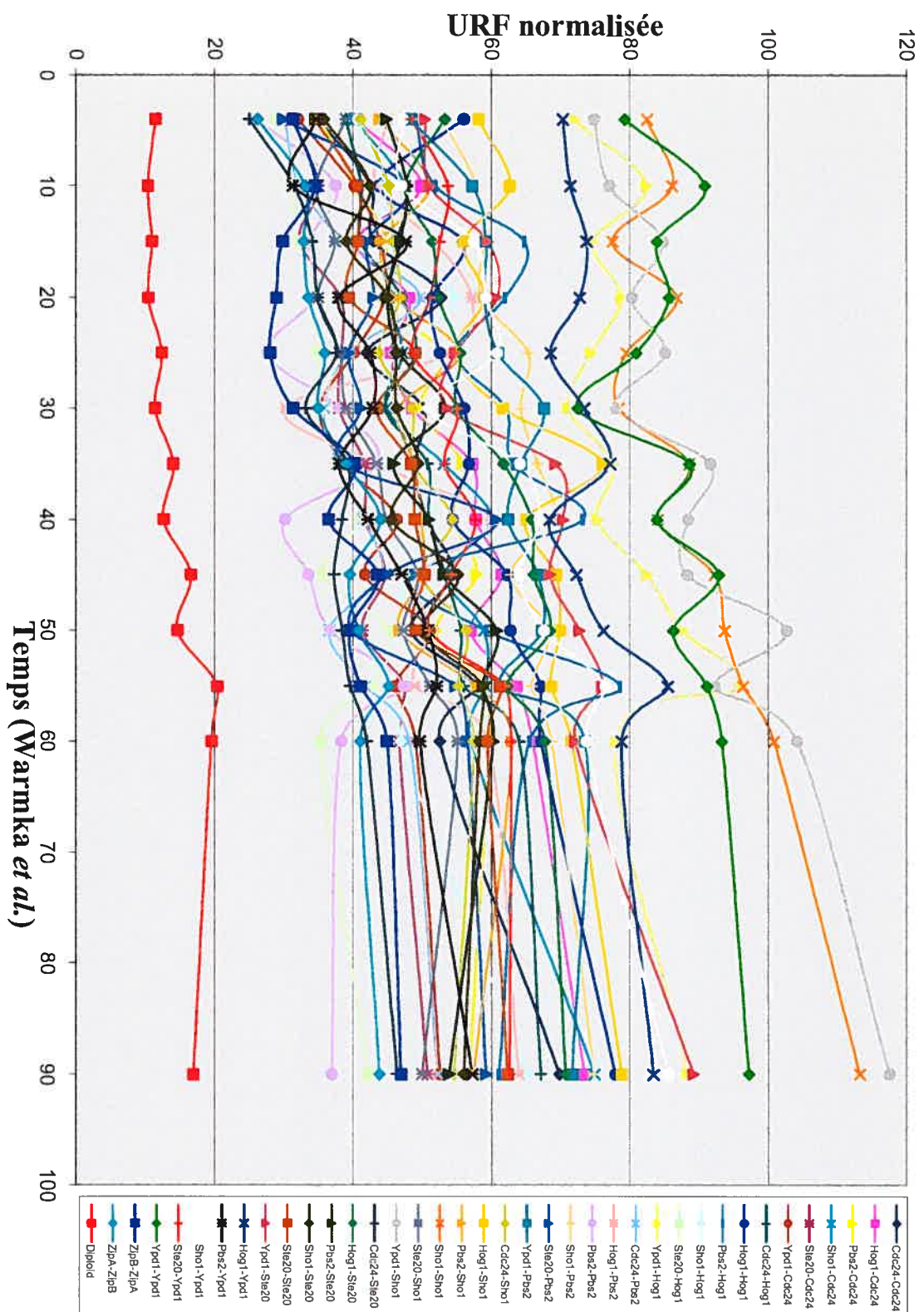
Enfin, on peut noter que lors d'un choc osmotique, les différentes souches de levure perdent rapidement une bonne proportion de leur taille (environ 50%). Après 5 minutes, les levures ont déjà repris une bonne partie de leur taille, mais ce n'est qu'après 30 minutes et plus que cette reprise permet à la cellule de retrouver la presque totalité de sa taille originale. Ces observations sont en accord avec les données rapportées dans la littérature (Hohmann 2002).

Cartographie dynamique

Comme la cartographie statique nous a permis de détecter des interactions entre les composantes de la voie HOG, et que nous avons pu vérifier le bon comportement dynamique de localisation de certaines composantes, nous nous sommes intéressés au comportement dynamique de ces protéines en réponse à une perturbation. Nous avons donc repris les souches de levures utilisées pour l'essai de cartographie PCA statique afin de cartographier la dynamique de la voie HOG en réponse à un stress osmotique. Les différentes combinaisons ont été placées sur une plaque de 96 puits. Ces souches de levures ont été exposées simultanément à un choc osmotique de 1M KCl, et des lectures du signal PCA émis ont été faites à des intervalles régulières pendant 90 minutes. La nécessité d'exposer les levures simultanément au choc osmotique ne permet pas de faire cette expérience en triplicata. Les résultats sont présentés à la figure 17.

De faibles fluctuations sont observées pour pratiquement toutes les souches, incluant la souche sauvage diploïde qui contrôle pour le bruit de fond. Ces faibles fluctuations ne dépassent pas la marge d'erreur de l'appareil. Aucun changement significatif (hausse ou chute) du signal émis par une paire de protéines d'intérêt n'est donc détecté. On remarque par contre une tendance générale d'unité relative de fluorescence normalisée allant à la hausse. Même l'autofluorescence des levures sauvages augmente légèrement avec le temps. Comme le lecteur de plaques rapporte une mesure pour une population de levures contenues dans un puit, il est possible d'expliquer cette faible tendance à la hausse par la létalité du choc osmotique pour

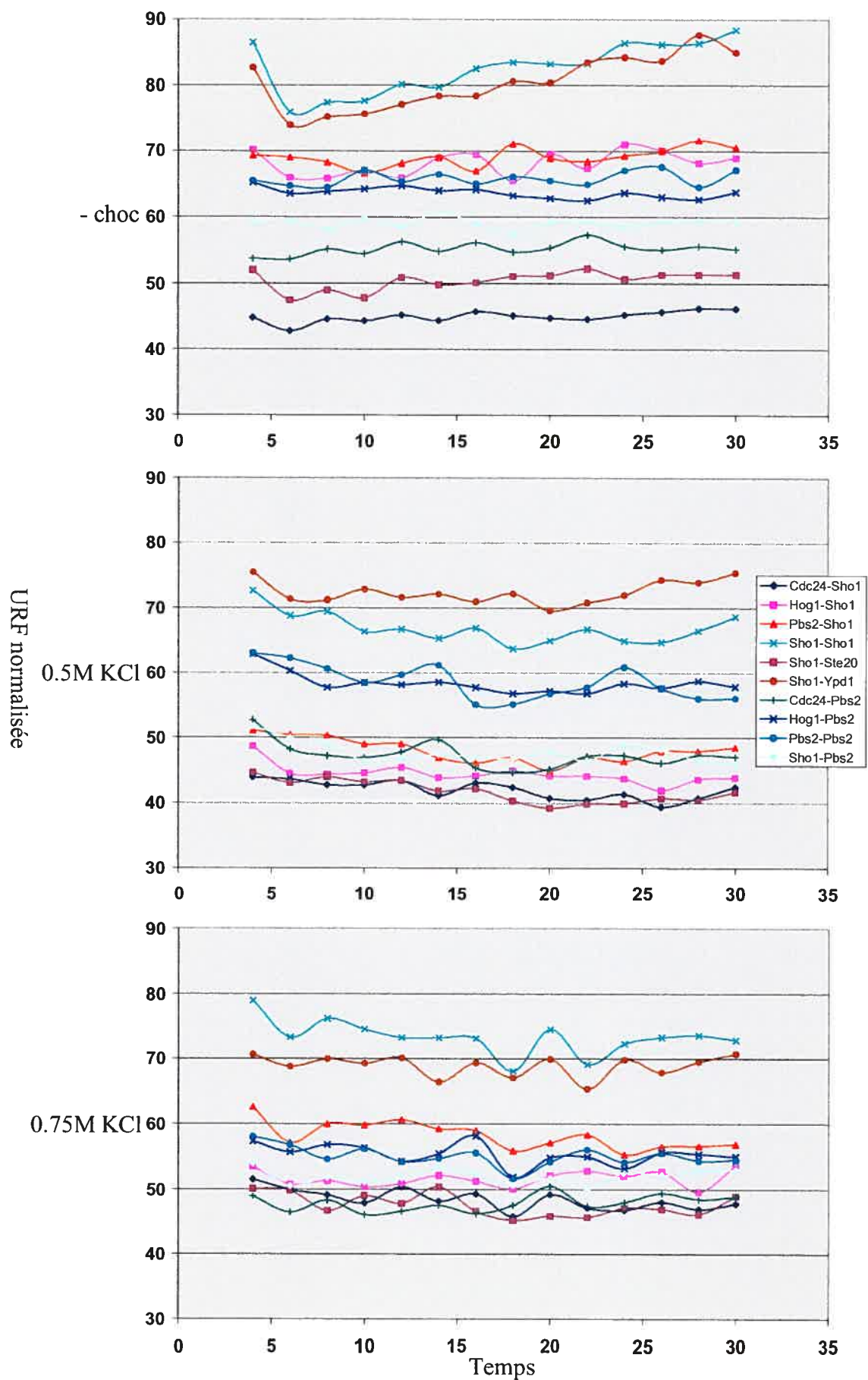
Figure 17 : Cartographie dynamique des composantes de la voie HOG en réponse au choc osmotique. Les souches de levures diploïdes utilisées pour l'essai de cartographie statique ont été utilisées dans un essai PCA dynamique. En abscisse, le temps après une stimulation par un choc osmotique de 1M KCl, en minutes, est indiqué. En ordonnée, la valeur d'URF normalisée à la densité optique pour chaque combinaison est indiquée. L'insert indique quelles courbes correspondent à quelles combinaisons de protéines d'intérêt, fusionnées respectivement au fragment 1 et au fragment 2 de la mCitrine.



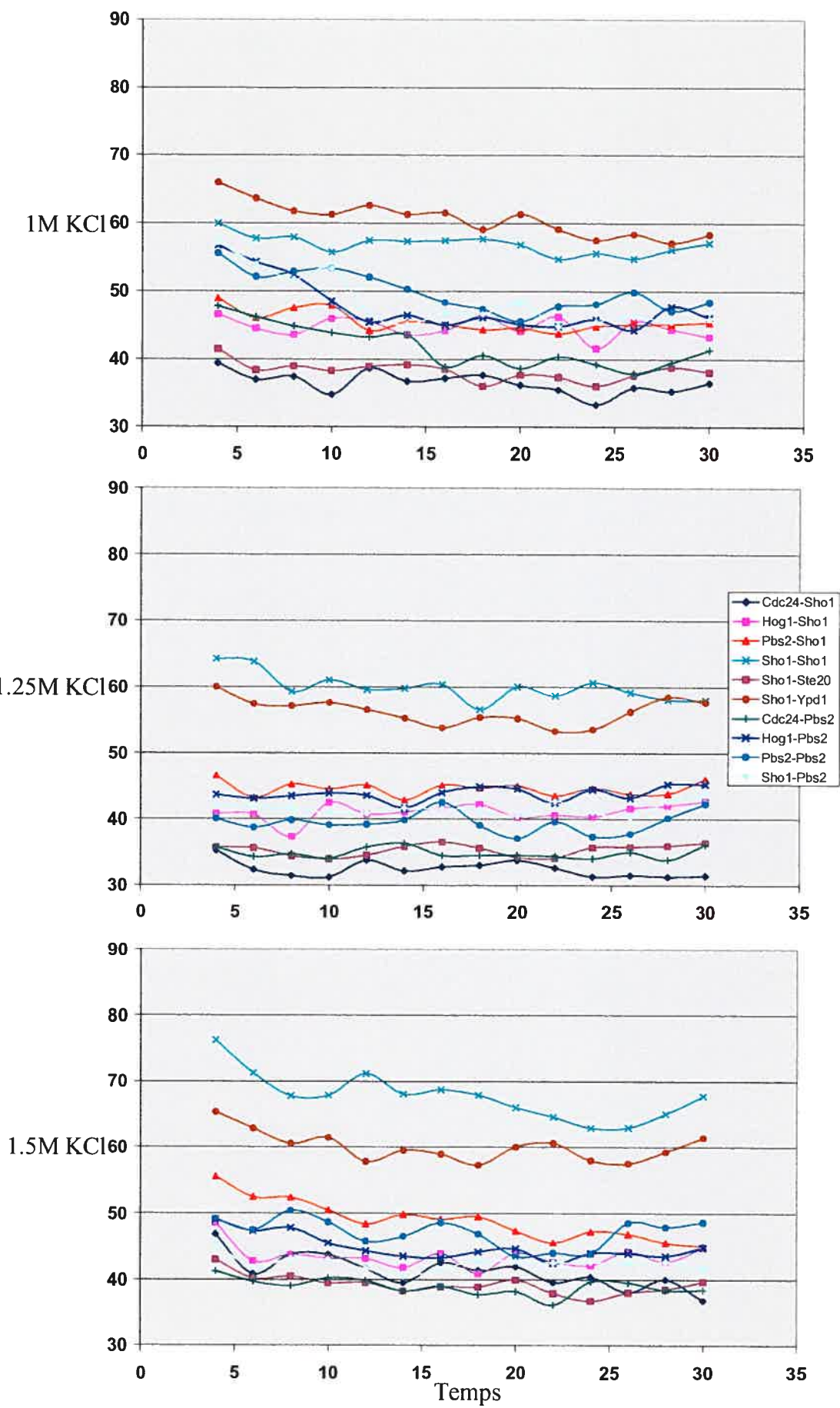
une partie de la population. En effet, les levures mourantes ont tendance à émettre plus d'autofluorescence que les levures en santé.

Comme la voie HOG répond à différentes gammes d'osmolarité, nous nous sommes demandés si la dynamique des interactions ne pourrait pas varier dépendamment du choc osmotique. Quelques souches exprimant des paires d'interactions, dont la modulation en réponse au choc osmotique est présumée, ont donc été sélectionnées pour reprendre l'essai de perturbation. Cette fois-ci, différentes concentrations de KCl ont été utilisées pour perturber les cellules, allant d'un choc osmotique faible à un choc osmotique sévère. Les résultats de ces essais sont présentés à la figure 18. Aucune différence significative n'est notée entre le signal de fluorescence émis par les souches exposées aux chocs osmotiques et les souches qui n'y sont pas exposées. Aussi, peu importe la sévérité du choc osmotique, il n'y a pas de variation significative du signal PCA. Aucune modulation des interactions en réponse au choc osmotique n'est donc détectée.

Figure 18 : Cartographie dynamique des composantes de la voie HOG en réponse à des chocs osmotiques de concentration variée. Des souches de levure diploïdes exprimant diverses combinaisons de deux protéines d'intérêt fusionnées aux fragments 1 et 2 de la mCitrine ont été exposées à des chocs osmotiques faibles (0.5M KCl), modérés (0.75M KCl), importants (1M KCl), ou sévères (1.25M et 1.5M KCl), ou encore ont été préservées dans leur milieu de culture sans choc osmotique (- choc). Des mesures de la fluorescence émise ont été prises à intervalles réguliers durant 30 minutes. L'insert indique quelles courbes correspondent à quelles combinaisons de protéines d'intérêt, fusionnées respectivement au fragment 1 et au fragment 2.



URF normalisée



Discussion

Le présent ouvrage s'inscrit dans la foulée de la biologie des systèmes, qui vise à intégrer les connaissances du fonctionnement moléculaire de la vie dans un modèle cohérent et représentatif de la réalité. Notre approche avait pour but d'utiliser des modèles simples afin de jeter les bases d'une meilleure compréhension du comportement dynamique des voies de signalisation. L'étude des interactions entre les composantes de ces voies de signalisation est un outil puissant à cette fin, puisque les interactions présentes dans les complexes fonctionnels de protéines sont à la base de la majorité des phénomènes dans la cellule. Notre approche a permis de détecter des interactions entre les composantes de la voie modèle HOG de *Saccharomyces cerevisiae* à l'état statique. De plus, il a été possible d'observer la dynamique de localisation de certaines des composantes. Par contre, le PCA par fluorescence n'a pas permis de détecter la modulation des interactions entre les composantes de la voie HOG lors d'un choc osmotique. Nous discuterons ici des résultats obtenus lors de la cartographie statique et de l'observation de la dynamique de localisation, ainsi que des raisons pouvant expliquer l'incapacité du PCA par fluorescence à détecter les modulations d'interactions, et des approches alternatives qui pourraient nous permettre d'y palier.

Choix du système expérimental

Il existe aujourd'hui de nombreuses variantes de la GFP, dont les propriétés de rapporteur sont de loin supérieures à la GFP originale. Par contre, malgré toutes ces optimisations, l'insertion de ces variantes directement sur le génome, en phase avec des ORFs des voies MAPK, nous a permis d'établir que le signal PCA émis n'était pas suffisant pour surpasser l'autofluorescence des levures. On peut expliquer ce phénomène par l'absence d'amplification du signal par le rapporteur, comme c'est le cas pour le FRET. Aussi, l'autofluorescence des levures, lorsqu'elles sont excitées à 495nm, atteint son maximum aux environs de la longueur d'onde d'émission optimale pour la GFP, ce qui nuit considérablement à la détection. L'autofluorescence des levures est de loin inférieure aux longueurs d'ondes utilisées pour la RFP. Malheureusement, bien qu'il existe maintenant une version

monomérique de cette protéine (Campbell *et al.* 2002), critère essentiel à tout rapporteur utilisé pour le PCA, la RFP n'a pas encore été développée pour des essais PCA. On peut aussi noter que bon nombre de protéines présentes dans les voies de signalisation sont exprimées en petites quantités dans les cellules. Comme le signal est amplifié, peu de protéines sont nécessaires au transport du signal. C'est le cas des protéines de la voie HOG, qui sont environ six fois moins exprimées qu'une protéine moyenne de cet organisme (Tableau IV) (Ghaemmaghani *et al.* 2003). Même les protéines de la voie HOG fusionnées au rapporteur fluorescent pleine longueur n'émettaient qu'un faible signal. L'approche de la recombinaison homologue nous a tout de même permis de détecter un signal provenant de protéines plus fortement exprimées. Par exemple, la détection de Cdc19p, une pyruvate kinase impliquée dans la glycolyse, a été possible, cette protéine étant présente en grande quantité dans les cellules (2.91×10^5 copies/cellule). Comme la recombinaison homologue ne procurait pas assez de signal pour permettre la détection des interactions par PCA, un système d'expression basé sur le plasmide a été choisi.

Le signal émis par notre rapporteur se devait d'être maximal, afin de permettre la détection du plus grand nombre possible d'interactions. Nous nous sommes donc demandé quelles variantes dérivées de la GFP nous procureraient un maximum de signal PCA. Une comparaison de différents mutants de la GFP et de la YFP optimisés pour l'expression dans la levure avait déjà été rapportée dans la littérature (Sheff *et al.* 2004). Toutefois, nous étions conscient que la fluorescence maximale émise par une de ces variantes sous sa forme pleine longueur n'était pas nécessairement garante du signal PCA. Puisque le PCA dépend du repliement de deux fragments scindés du rapporteur, le mécanisme de repliement pourrait être différent de celui de la protéine pleine longueur. Aussi, nous souhaitions vérifier si la mutation A206R, qui abroge la tendance qu'ont la GFP et ses variantes à dimériser, avait un effet sur le signal PCA. Comme cette mutation ne nuit pas aux propriétés fluorescentes de la protéine, et comme il est souhaitable que le rapporteur ne s'oligomériser pas, il était préférable de l'inclure dans notre essai.

Tableau IV: Niveau d'expression des différentes composantes de la voie HOG (Ghaemmaghami *et al.* 2003). Le nombre de copies estimées par cellule pour chaque protéine est indiqué, ainsi que la moyenne du nombre de copies par cellule pour les ORFs de la voie HOG et pour l'ensemble des ORFs de la levure. Les données pour Cdc42 ne sont pas disponibles.

Nom standard	Nom systématique	Nombre de copies par cellule
Sho1	YER118C	2.33×10^3
Cdc42	YLR229C	N/D
Ste20	YHL007C	2.59×10^2
Ste50	YCL032W	1.67×10^3
Ste11	YLR362W	7.36×10^2
Sln1	YIL147C	6.56×10^2
Ypd1	YDL235C	6.33×10^3
Ssk1	YLR006C	1.2×10^3
Ssk22	YNR031C	2.17×10^2
Ssk22	YCR073C	5.69×10^1
Pbs2	YJL128C	2.16×10^3
Hog1	YLR113W	6.78×10^3

	Valeur moyenne
Voie HOG	2.03×10^3
Ensemble des ORFs	1.21×10^4

La comparaison nous a permis d'établir que la mCitrine était la variante qui procurait le signal PCA le plus important. Comme il est difficile de distinguer qualitativement quelle variante émet un signal plus important, il nous a fallu quantifier celui-ci. Nous avons choisi de quantifier le signal à l'aide des deux méthodes que nous envisagions d'utiliser pour la cartographie, soit la microscopie et le FACS. La quantification par FACS est rapide et statistiquement solide, puisqu'un grand nombre de cellules peuvent être mesurées, procurant rapidement une idée globale de la distribution de la population. Par contre, le FACS ne donne qu'une mesure moyenne de la fluorescence émise par chaque cellule. Les subtilités de localisation du signal ne peuvent donc être distinguées. La microscopie est un bon complément au FACS, puisqu'elle permet de palier à cet inconvénient.

Les profils de fluorescence émise par les différentes variantes dans l'essai PCA sont similaires pour la microscopie et le FACS. La mutation A206R procure un léger avantage à la mCitrine pleine longueur par rapport à la Citrine, mais cet effet bénéfique est plus important dans le cas du PCA. Bien qu'il soit tentant de conclure que la mutation abrogeant la tendance à dimériser de la Citrine soit favorable à la formation d'un PCA, le cas de la mVenus vient brouiller les cartes. En effet, la mutation A206R pratiquée sur la Venus ne semble pas favoriser son signal PCA, qui demeure sensiblement identique à celui de la Venus sans mutation. Cette contradiction apparente est difficile à expliquer. La mutation A206R vient affecter une poche hydrophobe située à la surface extérieure du baril de la protéine repliée, diminuant la tendance à dimériser du fluorophore. On a pu observer, avec la structure tridimensionnelle de cristaux de GFP, que les deux GFP du dimère font contact au niveau de cette poche (Yang *et al.* 1996). Par contre, il a été établi que la mutation A206R n'affecte pas les propriétés fluorescentes ou spectrales de la protéine (Zacharias *et al.* 2002). Dans le cas de la protéine pleine longueur, nous n'observons effectivement pas de différence majeure entre la Citrine et la mCitrine. Seul le PCA semble être affecté. Avant toute spéculation au sujet du mécanisme pouvant expliquer cet effet, il faudrait effectuer des contrôles par Western Blot afin de s'assurer que la différence ne provient pas d'une variation au niveau de

l'expression des protéines de fusion entre les différentes souches. Bien que le promoteur soit identique pour les deux constructions, et que les deux protéines ne diffèrent que par une mutation ponctuelle n'introduisant pas de codon rare, une telle variation est toujours possible de souche en souche. Des limites de temps ne nous ont pas permis d'effectuer de tels contrôles. Nous avons donc opté pour l'utilisation de la mCitrine puisque son signal est maximal et puisqu'il est préférable que le rapporteur ne dimérise pas une fois reconstitué.

Enfin, notons que l'autofluorescence des cellules permet de discerner un signal de fluorescence émis par nos constructions d'un signal d'autofluorescence, mais que ce contrôle ne constitue pas un contrôle négatif valable. Pour obtenir un bon contrôle négatif, il aurait fallu fusionner aux fragments des variantes de la GFP deux protéines d'intérêt n'ayant pas d'affinité l'une pour l'autre. Un tel contrôle nous aurait permis de vérifier si les fragments n'avaient pas de propension à se replier de façon spontanée.

Cartographie statique

L'utilisation du PCA par fluorescence dans la levure n'a jusqu'ici jamais été rapporté. La carte d'interactions générée par ce premier essai nous a permis de détecter la grande majorité des interactions connues entre les composantes choisies de la voie HOG, en plus de révéler de nouvelles interactions potentielles. Une seule interaction connue n'a pas pu être détectée par PCA: celle entre Pbs2p et Sho1p. Or, cette interaction a été révélée par une immunoprécipitation pratiquée sur des lysats de levure (Posas *et al.* 1997). Comme la lyse des cellules pourrait provoquer une stimulation de la voie HOG, les conditions d'extraction utilisées lors de l'immunoprécipitation pourraient être à l'origine d'un artefact. On sait maintenant que Sho1p ne recrute Pbs2p à la membrane que lors d'un choc osmotique, et il est présumé qu'en état isoosmotique (comme c'est le cas pour notre cartographie statique), cette interaction n'a pas lieu. Ceci expliquerait l'absence de signal PCA entre ces deux protéines en absence de choc osmotique.

Il ne faut par contre pas négliger de mentionner que certaines des interactions, particulièrement celles dont le signal PCA se trouve tout juste au dessus du premier seuil, pourraient être des artefacts de la manipulation des cellules. Bien que la méthodologie employée n'implique pas de changement de milieu, et donc pas de changements au niveau de l'osmolarité, il serait envisageable que le simple fait de manipuler les cellules pourrait induire faiblement la voie HOG. Il est aussi possible que certaines interactions émettent un signal PCA faible qui ne parviendrait pas à dépasser le seuil de détection choisi. Comme toute méthode permettant de détecter les interactions entre protéines, le PCA par fluorescence souffre de problèmes de faux-positifs et faux-négatifs potentiels. On peut toutefois être plus confiant que les signaux qui se trouvent au dessus du second seuil sont de véritables positifs. La corrélation entre les interactions détectées au dessus de ce second seuil et celles rapportées dans la littérature donne plus de crédibilité à cette affirmation.

La cartographie d'interactions dans une voie de signalisation non stimulée soulève une question importante: quel est l'état de la voie HOG lorsqu'elle n'est pas stimulée, et que signifie une interaction dans ce contexte? Ces questions sont des symptômes du manque flagrant d'information concernant la dynamique des interactions dans les voies de signalisation. Il existe bien quelques exemples, dans nos modèles de mécanismes de signalisation, d'interactions présumées à l'état non-stimulé. L'interaction entre Ypd1p et Ssk1p, par exemple, a été révélée par plusieurs approches, et on sait aujourd'hui que cette interaction est essentielle à l'inhibition de l'activation de Ssk1p lorsque la cellule est en milieu isoosmotique. Ces exemples sont toutefois rares. La cartographie de voies de signalisation à l'état statique peut donc nous informer sur l'état des interactions entre les protéines composant la voie et nous permettre de soulever des hypothèses sur les fonctions biologiques de celle-ci en absence de stimulation.

La carte établie par l'essai PCA peut nous fournir des exemples de telles hypothèses. Il serait tentant de dire qu'en absence de choc osmotique, les composantes de la voie HOG sont en attente de stimulation, et que les interactions

détectées entre les composantes de la voie HOG n'ont pas de fonction biologique, mais on sait que même en absence de choc, la voie HOG accomplit un rôle biologique dans la cellule (voir l'introduction). On peut aussi se demander si des complexes de signalisation impliquant Pbs2p et les MAPK qui y sont liées seraient déjà formés en absence de stimulation de la voie, en attente d'un signal provoquant le recrutement du complexe préformé à la membrane, via Sho1p.

Notre cartographie de la voie HOG, bien qu'elle ne couvre qu'une partie de la voie, a permis de détecter plusieurs interactions potentielles à l'état statique entre les composantes de la voie HOG. La validation des interactions à l'aide de d'autres techniques biochimiques permettrait de soutenir les hypothèses concernant une organisation déjà présente de la voie HOG en absence de stimulation. Un tel mécanisme permettrait de mieux expliquer la rapidité et la spécificité du signal menant à l'activation de Hog1p en moins de quelques minutes après un choc osmotique. Une simple cartographie est donc insuffisante pour répondre aux questions quant à l'organisation de la voie HOG en absence de stimulus. D'autres études biochimiques seraient nécessaires pour soutenir l'hypothèse selon laquelle la voie HOG est organisée en absence de stimulus de façon à accélérer le transfert de l'information lors d'une stimulation.

Aussi, on peut remarquer la présence de dimères potentiels (ou possiblement d'oligomères) pour Sho1p, Pbs2p et Hog1p. Or, dans la voie de réponse aux phéromones, l'oligomérisation de Ste5p, la protéine échafaud de la voie de réponse aux phéromones, a été rapportée (Elion 2001). Des chercheurs ont démontré que l'oligomérisation du complexe de signalisation était essentielle à une bonne transmission du signal. Par contre, il n'est pas établi si la transmission du signal se déroule en cis, entre les protéines de la cascade MAPK situées sur le même échafaud, ou si elle n'aurait pas plutôt lieu en trans, entre les MAPK situés sur deux ou plusieurs échafauds. Les interactions révélées par la carte d'interactions générée par PCA nous permet de soulever les questions suivantes: serait-il possible que Pbs2p se comporte comme Ste5p, en oligomérisant et en assemblant la cascade

MAPK dans un complexe impliquant deux ou plusieurs copies de chaque protéine? Si oui, la transmission du signal se fait-elle en cis ou en trans?

Ces cartes d'interaction peuvent aussi être utilisées pour infirmer des hypothèses déjà soulevées. Par exemple, il a été proposé que Hog1p dimérise (voir l'introduction). Cette dimérisation pourrait permettre l'autophosphorylation de Hog1p qui survient lors de chocs osmotiques sévères. La dimérisation de Hog1p n'a toutefois jamais été rapportée. La cartographie PCA a toutefois permis de détecter cette interaction potentielle, qui se trouve à peine en dessous du second seuil, ce qui vient supporter cette hypothèse (sans toutefois la confirmer).

Cette utilisation du PCA par fluorescence pour la cartographie d'interactions protéine-protéine dans la levure est la première à être rapportée. Le PCA semble fonctionner comme outil de détection d'interactions, puisque les interactions détectées (mêmes celles dont le signal PCA se retrouve au dessus du second seuil) sont soit déjà rapportées dans la littérature, ou alors semblent possibles d'un point de vue biologique. Comme l'échantillon de protéines choisies est petit, il est difficile d'établir la fiabilité du PCA par fluorescence. Il faudrait, pour ce faire, élargir le nombre de protéines d'intérêt, et choisir des partenaires d'interaction bien caractérisés dont l'interaction survient dans le cours normal des processus biologiques de la cellule, sans nécessiter de perturbations. Il y a toutefois des limites au nombre de protéines pouvant être réalistement utilisées pour cet essai. Amplifier et extraire du génome un grand nombre d'ORFs pour les sous-cloner dans des vecteurs d'expression représente un travail colossal et difficile. Pour les applications à grande échelle, le PCA DHFR, un essai PCA de survie qui fait usage du rapporteur DHFR, est mieux adapté pour cette tâche. Cet essai PCA est très sensible, ne nécessitant que quelques molécules de DHFR reconstituées pour permettre la survie (Remy *et al.* 1999). Il est donc possible d'utiliser la recombinaison homologue avec cet essai. Notre laboratoire s'emploie présentement à cartographier de cette façon les interactions entre les quelques 6000 protéines de la levure. Toutefois, l'essai PCA DHFR ne permet pas de suivre la dynamique rapide

des interactions en temps réel, puisque c'est un essai de survie. C'est pourquoi nous souhaitons développer l'essai PCA par fluorescence à cette fin.

La nature des interactions entre tous les membres de la voie HOG n'a pas encore été établie systématiquement et avec certitude (bien que cette voie soit aujourd'hui la mieux caractérisée chez la levure). Le choix d'un contrôle négatif pour notre essai PCA, consistant en deux protéines qui n'interagissent pas ensemble, était donc difficile, compte tenu du manque d'informations. En effet, l'absence d'une interaction rapportée entre deux partenaires n'est pas garante de l'absence réelle de toute forme d'interaction. Il a tout de même fallu faire un choix. Nous avons donc choisi deux protéines normalement situées dans le noyau et qui répondent à une autre voie de signalisation (Ste12p et Far1p). Malheureusement, ces deux ORFs n'ont pu être sous-clonés avec succès dans les vecteurs d'expression. Comme il est peu probable que toutes les composantes de la voie HOG interagissent entre elles d'une façon ou d'une autre, les signaux les plus bas provenant de la cartographie ont donc été choisis comme contrôles négatifs par défaut.

Les contrôles positifs WinZip A et B n'ont pas donné les résultats escomptés. En effet, ni la combinaison de Winzip A fusionné au fragment 1 de la mCitrine contre Winzip B fusionné au fragment 2, ni la combinaison de Winzip A fusionné au fragment 2 de la mCitrine contre WinZipB fusionné au fragment 1 n'ont permis d'obtenir un signal PCA significativement au dessus du seuil de détection. Ce résultat étonnant a également été observé par un consocier au laboratoire utilisant les mêmes Zippers dans la levure. Comme les constructions ont été séquencées et que leur présence dans la levure a été diagnostiquée, il faudrait vérifier si ces deux protéines sont bel et bien exprimées. Comme ces Zippers ont été développés pour des essais dans les bactéries, ils pourraient être la cible de protéases dans la levure. Il a été observé que des Zippers de leucine construits de façon synthétique qui formaient d'excellentes paires d'interactions échouaient lorsque exprimés sous formes de protéine de fusion car ils étaient dégradés par protéolyse (Arndt *et al.* 2000). Dans les essais, les Zippers de leucine GCN4 sont fréquemment utilisés car

leur interaction est forte et produit un bon signal PCA. Ras et le RBD de Raf sont moins souvent utilisés comme contrôles positifs, puisque leur signal est moins puissant.

Le temps ne nous a pas permis de refaire la cartographie statique avec un nouveau contrôle positif. Toutefois, si on se fie aux essais de comparaison des différents fluorophores (voir figure 12), on peut établir que le signal PCA entre Ras et le RBD de Raf provenant d'un système identique est environ 4.25 fois supérieur au niveau d'autofluorescence des levures diploïdes. Si on rapporte ce facteur de multiplication à l'autofluorescence produite par les levures diploïdes dans l'essai de cartographie statique sur lecteur de plaque, on obtient une valeur d'URF de 79, ce qui est légèrement supérieur au premier seuil de détection choisi, qui est d'environ 76 (voir figure 13). Ainsi donc, théoriquement, ce seuil aurait permis la détection de l'interaction entre Ras et le RBD de Raf. Malgré ces suppositions, il faudrait répéter l'expérience de cartographie statique avec un contrôle positif fonctionnel. Notre laboratoire cherche présentement à établir un ou des contrôles positifs qui seraient adéquat aux essais PCA. Le contrôle positif idéal consiste en une paire d'interactions formée par des protéines provenant d'un autre organisme qui interagissent spécifiquement, avec une grande affinité, et de façon hétérodimérique sans toutefois interagir avec les protéines de l'organisme ou perturber le fonctionnement biologique de celui-ci. Le fait de pouvoir moduler l'affinité des deux protéines, avec un ligand par exemple, serait également une propriété souhaitable, puisqu'un tel contrôle permettrait d'établir la sensibilité inférieure de l'essai.

Dynamique de localisation des protéines

Avant d'observer le comportement dynamique des interactions en réponse au choc osmotique, nous souhaitons établir si le comportement des protéines surexprimées était similaire à celui des protéines endogènes. La surexpression de protéines peut souvent mener à une mauvaise localisation de celles-ci. Pour ce faire, la localisation des composantes de la voie HOG en réponse au choc osmotique a été étudiée par

microscopie grâce au marqueur mCitrine pleine longueur attaché au C-terminal des protéines d'intérêt. Malheureusement, il n'a pas été possible d'obtenir un plus grand nombre de constructions positives, faute de temps.

Tel que prédit par la littérature (voir figure 4), la localisation de Hog1p, en absence de choc osmotique, est cytoplasmique. Lors d'un choc osmotique, Hog1p fusionnée à la mCitrine pleine longueur transite rapidement vers le noyau. Après 3 min de choc osmotique, on peut déjà distinguer une augmentation de sa localisation nucléaire (données non-illustrées), et après 5 min, la localisation nucléaire croissante est clairement visible. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature et avec le comportement normal de Hog1p. On note aussi une faible diminution de la fluorescence avec le temps, probablement due à l'extinction du fluorophore provoquée par des expositions répétées au laser excitant.

La localisation de Sho1p fusionnée à la mCitrine pleine longueur est également similaire à ce qui a été rapporté dans la littérature, avec ou sans choc osmotique. Sho1p demeure effectivement localisée dans le bourgeon et sur les plaques de croissance polarisée à la membrane. On peut toutefois noter, qualitativement, que la fluorescence émise par le fluorophore diminue plus rapidement que dans le cas de Hog1p ou Ypd1p. Un phénomène autre que l'extinction provoquée par l'exposition au laser pourrait ici être en jeu. Les cellules représentées à la figure 16 sont représentatives des observations faites sur d'autres cellules de souche similaire.

Bien que la localisation cytoplasmique de Ypd1p soit connue (Huh *et al.* 2003), la dynamique de sa localisation en réponse au choc osmotique n'a jusqu'ici pas été rapportée. Nos observations confirment la localisation cytoplasmique de cette protéine en absence de choc osmotique. Lors d'un choc, nous n'observons pas de changements qualitatifs de localisation de Ypd1p, qui demeure dans le cytoplasme

Comme le comportement des protéines surexprimées était similaire à celui des protéines sauvages, nous nous sommes demandé si la dynamique des interactions entre les composantes pouvait être suivie par PCA.

Cartographie dynamique

Il n'a pas été possible de détecter de modulation significative du signal provenant de l'essai PCA par fluorescence en réponse au choc osmotique. Un choc osmotique de 1M KCl, fréquemment utilisé pour susciter une pleine réponse de la voie HOG, n'a pas provoqué de perturbation visible dans le patron des signaux de fluorescence. On sait que la voie HOG répond à diverses gammes de chocs osmotiques. Il était donc possible qu'une condition particulière de choc osmotique puisse susciter une réponse détectable. Nous avons donc perturbé la voie HOG avec des chocs osmotiques allant de faibles à sévères, mais aucune perturbation n'a pu être observée dans cet essai. Plusieurs raisons peuvent expliquer l'incapacité du PCA par fluorescence basé sur des plasmides à détecter la modulation des interactions dans la voie HOG.

D'abord, mentionnons que de récentes observations tendent à soutenir que le PCA par fluorescence serait un piège moléculaire. Des études *in vitro* soutiennent qu'une fois le fluorophore replié, celui-ci ne serait plus en mesure de se déplier spontanément, puisque le signal provenant de l'essai demeure pratiquement constant avec le temps, même si l'interaction entre les deux partenaires est abrogée (Magliery *et al.* 2005). Ceci soulève une importante question sur le PCA par fluorescence: si cette approche est un piège moléculaire, alors celui-ci ne vient-il pas perturber l'équilibre des interactions? Il est en effet probable qu'un piège moléculaire vienne ainsi perturber l'équilibre des interactions. Un piège moléculaire pourrait stabiliser des interactions déjà formées avant l'arrivée d'un stimulus d'activation, ou encore, pourrait augmenter artificiellement la concentration des partenaires d'interaction formés à la suite d'une activation par le stimulus. Dans certains cas, il est envisageable que cette perturbation du fonctionnement normal de

la voie vienne modifier ses propriétés et le comportement des protéines effectrices. Par exemple, le prolongement artificiel du rapprochement d'une kinase activée et son substrat pourrait provoquer une transmission plus longue du signal vers l'amont, ou encore nuire à une boucle de rétroaction en empêchant une phosphatase de venir déphosphoryler sa kinase cible.

Toutefois, il faut se demander si cette propriété est nécessairement une limite pour l'étude de la dynamique des interactions dans les voies de signalisation. Bien qu'il serait souhaitable que la protéine se déplie si les partenaires d'interaction cessent d'interagir, cette contrainte peut être soit une nuisance, soit une aide pour l'essai PCA. En étant conscient de cette limite, on peut comprendre qu'un PCA qui serait un piège moléculaire serait en fait un intégrateur, ajoutant au système une protéine rapporteuse repliée additionnelle à chaque fois qu'une interaction le permet, et conservant ce signal rapporteur dans le temps. Ainsi donc, en quantités non limitantes, un PCA par fluorescence effectué *in vitro* sur des partenaires d'interaction accumulerait du signal avec le temps. *In vivo* les choses se compliquent. Il n'a pas été démontré que le PCA par fluorescence est un piège moléculaire *in vivo*. La présence de chaperonnes, ou encore d'autres facteurs, pourraient y faciliter le repliement et le dépliement des fragments. Aussi, il faut prendre en compte la dégradation par protéolyse, qui renouvelle la population de protéines et éliminerait progressivement les complexes repliés. En fait, si le PCA par fluorescence s'avérait être un piège moléculaire *in vivo*, cette propriété pourrait jouer à notre avantage. Si un événement est transitoire, il peut être difficile de le détecter, mais en intégrant la somme des événements transitoires, un piège moléculaire permettrait de détecter un signal qui, ponctuellement, n'est qu'une faible variation.

Essentiellement, le PCA par fluorescence utilisé pour observer la dynamique des interactions en réponse à un stimulus ne vise pas à reproduire parfaitement l'état des complexes de protéines dans le temps. Son but est plutôt de rapporter les changements qui peuvent s'effectuer dans les complexes de signalisation, et dans

quel ordre ces changements ont lieu. L'argument soutenant qu'un piège moléculaire pourrait perturber les voies de signalisation et modifier leur comportement se base sur la présomption que la dynamique de la transmission du signal dans les voies de signalisation dépend de l'équilibre des interactions entre les partenaires de la voie. Or, on sait que les voies de signalisation ne dépendent pas nécessairement de tels mécanismes d'équilibre, mais se comportent plutôt comme des interrupteurs, puisque l'état de phosphorylation dicte si une protéine est active ou inactive, et non pas son équilibre d'interaction avec ses substrats. Un piège moléculaire ne viendrait pas nécessairement perturber la transmission du signal dans une cascade d'interrupteurs. Néanmoins, il serait important de déterminer si le PCA par fluorescence est un piège moléculaire *in vivo*. Pour ce faire, il faudrait exprimer, dans la levure, une paire de protéines d'intérêt dont l'interaction est modulable et la dégradation par protéolyse est lente. On pourrait alors comparer, dans le temps, la fluorescence de levures chez qui la stimulation permettant l'interaction est maintenue à des levures où une telle stimulation est retirée.

On pourrait aussi expliquer l'incapacité du PCA par fluorescence à détecter les modulations d'interactions par le fait que notre système est la source d'une surexpression des composantes de la voie, ce qui peut venir perturber son fonctionnement. Pourtant, nos observations par microscopie portant sur la dynamique de localisation de quelques composantes de la voie indiquent que le comportement des protéines surexprimées est similaire à celui des protéines endogènes tel que rapporté dans la littérature. Les levures sont aussi capables de répondre normalement au choc osmotique, récupérant une bonne partie de la taille perdue lors du choc osmotique après 30 minutes. Par contre, si, dans l'essai PCA, seule une petite partie de la population des protéines d'intérêt est responsable de transmettre un signal, et que la majeure partie de la population n'est pas impliquée dans ce mécanisme, il est possible que le nombre d'interactions nécessaires à la transmission du signal ne permette pas de reconstituer suffisamment de rapporteurs pour permettre la détection. Ce phénomène est particulièrement attendu si on

surexprime les protéines, donnant à la cellule un nombre beaucoup plus grand de protéines de signalisation qu'elle n'en a besoin.

On peut minimiser cet effet en choisissant un promoteur qui exprime suffisamment de protéines de fusion pour permettre la détection, sans toutefois inutilement surexprimer en trop grande quantité ces protéines. Le promoteur ADH était le promoteur constitutif le plus faible à notre disposition. Il est caractérisé comme étant un promoteur de force moyenne (Mumberg *et al.* 1995). C'est pourquoi il a été choisi pour notre essai. On peut minimiser d'avantage l'inconvénient de la surexpression en faisant usage de recombinaison homologue pour insérer les constructions directement sur le génome, sous contrôle du promoteur endogène. Ceci permet de laisser la cellule réguler l'expression des protéines de fusion comme elle le ferait pour les protéines endogènes. Il n'a toutefois pas été possible de faire usage de cette méthode en combinaison avec le PCA par fluorescence par manque de sensibilité.

Il est aussi probable que le PCA par fluorescence soit simplement trop lent pour répondre aux changements rapides survenant au niveau des interactions entre les protéines de la voie HOG lorsque celle-ci est stimulée. Même si les mutants de la GFP utilisés ont une vitesse de repliement beaucoup plus rapide que la protéine sauvage, celui-ci se trouve tout de même dans l'ordre des quelques minutes (Reid *et al.* 1997). Or, on sait qu'en trois minutes, Hog1p est phosphorylée et son accumulation dans le noyau débute. Tout changement dans la cascade MAPK menant à l'activation de Hog1p doit donc s'effectuer en moins de trois minutes. Si ces changements sont transitoires, il est fort probable que le rapporteur mCitrine soit incapable de se replier à temps pour permettre l'intégration du signal. Nous étions conscient de ces limites lorsque l'approche a été mise sur pieds. Toutefois, nous nous attendions à ce que certains changements ne soient pas transitoires, et qu'il serait possible de les détecter, ce qui n'a pas été le cas.

Pour contourner ce problème, il faudrait choisir un modèle dans lequel la modulation des interactions et la transmission du signal se fait plus lentement. Par exemple, les voies métaboliques réagissent plus lentement aux changements de métabolites. De plus, le niveau d'expression des protéines est souvent plus élevé dans les voies métaboliques. La voie de synthèse du glycogène est une voie qui est bien caractérisée chez la levure, et cette voie pourrait s'avérer être un modèle plus adapté et plus simple permettant de mettre au point un PCA dynamique. Il serait aussi envisageable conserver la voie HOG comme modèle, mais de plutôt se concentrer sur les récepteurs nucléaires et les phosphatases de la voie. Comme l'osmoadaptation peut prendre au-delà de 30 minutes après l'activation de HOG pour activer ses mécanismes de réponse génétiques, ces protéines pourraient être mieux adaptées à l'étude de leur dynamique.

Notre laboratoire vient également de développer un essai PCA qui utilise la luciférase de *Renilla* comme enzyme rapporteuse. La luciférase est une enzyme qui catalyse une réaction menant à la luminescence. Chaque enzyme peut catalyser de nombreuses réactions, et son signal est donc amplifié. Ce PCA a permis la détection d'interactions dans la levure en utilisant la recombinaison homologe (données non publiées). Bien que ce PCA n'était pas encore développé lorsque la démarche du présent ouvrage a débuté, sa plus grande sensibilité pourrait faire de la luciférase un meilleur rapporteur que la GFP et ses variantes pour un essai PCA dynamique.

Le PCA par fluorescence faisant usage de la mCitrine a permis de cartographier une voie de signalisation à l'état statique. Cette carte a permis non seulement de déceler de nouvelles interactions potentielles, mais elle a aussi démontré qu'il est possible de soulever de nouvelles hypothèses de recherche basées sur les interactions observées et d'infirmer des hypothèses déjà existantes. Toutefois, ce PCA s'est avéré incapable de suivre la dynamique des interactions au niveau de la voie HOG en réponse au choc osmotique. Le développement d'un PCA permettant une telle application fournirait à la communauté scientifique un outil formidable lui permettant d'observer en temps réel le comportement dynamique des complexes de

protéines, qui sont à la base des processus biologiques de la cellule. De tels outils n'ont pas encore été développés. Nous envisageons utiliser un PCA capable de détecter les modulations dynamiques afin de cartographier simultanément plusieurs protéines de différentes voies et étudier leur comportement en réponse à diverses perturbations: physiologiques (en activant la voie avec son stimulus naturel), génétiques (en utilisant les banques de KO mises à notre disposition), chimiques (certains produits ont un effet particulier sur les voies de signalisation. Il est aussi envisagé d'observer les mécanismes qui permettent de contrôler tout débordement du signal d'une voie à l'autre en stimulant une ou plusieurs voies et en observant l'effet de cette stimulation sur une autre. Un tel essai nécessiterait le développement d'outils à large échelle afin d'établir ce qui pourrait être comparé à un spectromètre de la cellule, un outil qui viendrait spécifiquement répondre aux besoins criants de la biologie des systèmes.

La finalité d'un tel procédé est de créer des modèles dynamiques de voies de signalisation. Des outils bioinformatiques ont déjà permis de créer de tels modèles pour la voie MAPK de réponse aux phéromones (Kofahl *et al.* 2004), ainsi que pour celle de réponse au stress osmotique (Klipp *et al.* 2005). Ces modèles nécessitent encore des ajustements afin de correspondre à la réalité, et sont encore imparfaits. Par exemple, le modèle de la voie HOG souffre beaucoup du manque d'informations quantitatives concernant la dynamique des composantes de la voie, et a dû se contenter de ne modéliser que la branche Sln1. Le but de créer des modèles toujours plus fidèles à la réalité ne pourra être atteint qu'en générant des données quantitatives sur la dynamique des systèmes étudiés. De tels modèles permettront d'abandonner les modèles classiques, qui représentent les procédés biologiques à l'aide de flèches et de nœuds, pour migrer vers des modèles qui tiennent mieux compte des concepts de temps et d'espace, et de leur dynamique. Par le fait même, ces modèles seront plus fidèles à la réalité, nous permettront de prédire l'effet de perturbations au système, de générer de nouvelles hypothèses, et surtout, seront le point de départ d'une compréhension plus exhaustive des processus qui sont à la base de la vie.

Bibliographie

1. Aguilera, J., S. Rodriguez-Vargas, and J.A. Prieto, *The HOG MAP kinase pathway is required for the induction of methylglyoxal-responsive genes and determines methylglyoxal resistance in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol, 2005. **56**(1): p. 228-39.
2. Alepuz, P.M., et al., *Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II*. Embo J, 2003. **22**(10): p. 2433-42.
3. Alexander, M.R., et al., *Regulation of cell cycle progression by Swe1p and Hog1p following hypertonic stress*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(1): p. 53-62.
4. Angers, S., et al., *Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3684-9.
5. Arndt, K.M., et al., *A heterodimeric coiled-coil peptide pair selected in vivo from a designed library-versus-library ensemble*. J Mol Biol, 2000. **295**(3): p. 627-39.
6. Bao, M.Z., et al., *Pheromone-dependent destruction of the Tec1 transcription factor is required for MAP kinase signaling specificity in yeast*. Cell, 2004. **119**(7): p. 991-1000.
7. Bardwell, L., *A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway*. Peptides, 2004. **25**(9): p. 1465-76.
8. Bill, R.M., *Yeast--a panacea for the structure-function analysis of membrane proteins?* Curr Genet, 2001. **40**(3): p. 157-71.
9. Blomberg, A. and L. Adler, *Physiology of osmotolerance in fungi*. Adv Microb Physiol, 1992. **33**: p. 145-212.
10. Brewster, J.L., et al., *An osmosensing signal transduction pathway in yeast*. Science, 1993. **259**(5102): p. 1760-3.
11. Brewster, J.L. and M.C. Gustin, *Positioning of cell growth and division after osmotic stress requires a MAP kinase pathway*. Yeast, 1994. **10**(4): p. 425-39.
12. Caffrey, D.R., L.A. O'Neill, and D.C. Shields, *The evolution of the MAP kinase pathways: coduplication of interacting proteins leads to new signaling cascades*. J Mol Evol, 1999. **49**(5): p. 567-82.
13. Campbell, R.E., et al., *A monomeric red fluorescent protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 7877-82.
14. Causton, H.C., et al., *Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(2): p. 323-37.
15. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
16. Cheng, A., et al., *Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases*. Genes Dev, 1999. **13**(22): p. 2946-57.
17. Chou, S., L. Huang, and H. Liu, *Fus3-regulated Tec1 degradation through SCFCdc4 determines MAPK signaling specificity during mating in yeast*. Cell, 2004. **119**(7): p. 981-90.

18. Cooper, J.A., *MAP kinase pathways. Straight and narrow or tortuous and intersecting?* Curr Biol, 1994. **4**(12): p. 1118-21.
19. Cormack, B.P., et al., *Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in Candida albicans.* Microbiology, 1997. **143** (Pt 2): p. 303-11.
20. Cullen, P.J., et al., *A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast.* Genes Dev, 2004. **18**(14): p. 1695-708.
21. Cvrckova, F., et al., *Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast.* Genes Dev, 1995. **9**(15): p. 1817-30.
22. Davenport, K.D., et al., *Activation of the Saccharomyces cerevisiae filamentation/invasion pathway by osmotic stress in high-osmolarity glycogen pathway mutants.* Genetics, 1999. **153**(3): p. 1091-103.
23. de Nadal, E., L. Casadome, and F. Posas, *Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(1): p. 229-37.
24. Drogen, F., et al., *Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling in vivo.* Curr Biol, 2000. **10**(11): p. 630-9.
25. Droit, A., G.G. Poirier, and J.M. Hunter, *Experimental and bioinformatic approaches for interrogating protein-protein interactions to determine protein function.* J Mol Endocrinol, 2005. **34**(2): p. 263-80.
26. Elion, E.A., *Pheromone response, mating and cell biology.* Curr Opin Microbiol, 2000. **3**(6): p. 573-81.
27. Elion, E.A., *The Ste5p scaffold.* J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 22): p. 3967-78.
28. Errede, B., et al., *Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways.* Mol Reprod Dev, 1995. **42**(4): p. 477-85.
29. Farooq, A. and M.M. Zhou, *Structure and regulation of MAPK phosphatases.* Cell Signal, 2004. **16**(7): p. 769-79.
30. Ferrigno, P., et al., *Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1.* Embo J, 1998. **17**(19): p. 5606-14.
31. Fields, S. and O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions.* Nature, 1989. **340**(6230): p. 245-6.
32. Galarneau, A., et al., *Beta-lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein protein interactions.* Nat Biotechnol, 2002. **20**(6): p. 619-22.
33. Garcia-Rodriguez, L.J., A. Duran, and C. Roncero, *Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the Saccharomyces cerevisiae HOG pathway under noninducing conditions.* J Bacteriol, 2000. **182**(9): p. 2428-37.
34. Garrington, T.P. and G.L. Johnson, *Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways.* Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(2): p. 211-8.

35. Gasch, A.P., et al., *Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(12): p. 4241-57.
36. Ghaemmaghami, S., et al., *Global analysis of protein expression in yeast*. Nature, 2003. **425**(6959): p. 737-41.
37. Ghosh, I., A.D. Hamilton, and L. Regan, *Antiparallel Leucine Zipper-Directed Protein Reassembly: Application to the Green Fluorescent Protein*. J Am Chem Soc, 2000. **122**: p. 5658-5659.
38. Gietz, R.D. and R.A. Woods, *Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method*. Methods Enzymol, 2002. **350**: p. 87-96.
39. Goffeau, A., et al., *Life with 6000 genes*. Science, 1996. **274**(5287): p. 546, 563-7.
40. Gorner, W., et al., *Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity*. Genes Dev, 1998. **12**(4): p. 586-97.
41. GRID, *Site GRID (General Repository for Interaction Datasets)*.
42. Gustin, M.C., et al., *MAP kinase pathways in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(4): p. 1264-300.
43. Hall, J.P., et al., *The osmoregulatory pathway represses mating pathway activity in Saccharomyces cerevisiae: isolation of a FUS3 mutant that is insensitive to the repression mechanism*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(12): p. 6715-23.
44. Han, J., et al., *A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells*. Science, 1994. **265**(5173): p. 808-11.
45. Harju, S., H. Fedosyuk, and K.R. Peterson, *Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab*. BMC Biotechnol, 2004. **4**: p. 8.
46. Harris, K., et al., *Role of scaffolds in MAP kinase pathway specificity revealed by custom design of pathway-dedicated signaling proteins*. Curr Biol, 2001. **11**(23): p. 1815-24.
47. Herrmann, C., et al., *Differential interaction of the ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor*. J Biol Chem, 1996. **271**(12): p. 6794-800.
48. Herskowitz, I., *MAP kinase pathways in yeast: for mating and more*. Cell, 1995. **80**(2): p. 187-97.
49. Hohmann, S., *Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts*. Microbiol Mol Biol Rev, 2002. **66**(2): p. 300-72.
50. Huh, W.K., et al., *Global analysis of protein localization in budding yeast*. Nature, 2003. **425**(6959): p. 686-91.
51. Ito, T., et al., *Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1143-7.
52. Jacoby, T., et al., *Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1*. J Biol Chem, 1997. **272**(28): p. 17749-55.

53. Jansen, G., et al., *Mutations in the SAM domain of STE50 differentially influence the MAPK-mediated pathways for mating, filamentous growth and osmotolerance in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Genet Genomics, 2001. **265**(1): p. 102-17.
54. Jonak, C., W. Ligterink, and H. Hirt, *MAP kinases in plant signal transduction*. Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(2): p. 204-13.
55. Khokhlatchev, A.V., et al., *Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation*. Cell, 1998. **93**(4): p. 605-15.
56. Klipp, E., et al., *Integrative model of the response of yeast to osmotic shock*. Nat Biotechnol, 2005.
57. Kofahl, B. and E. Klipp, *Modelling the dynamics of the yeast pheromone pathway*. Yeast, 2004. **21**(10): p. 831-50.
58. Lu, J.M., R.J. Deschenes, and J.S. Fassler, *Saccharomyces cerevisiae histidine phosphotransferase Ypd1p shuttles between the nucleus and cytoplasm for SLN1-dependent phosphorylation of Ssk1p and Skn7p*. Eukaryot Cell, 2003. **2**(6): p. 1304-14.
59. Madhani, H.D., C.A. Styles, and G.R. Fink, *MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation*. Cell, 1997. **91**(5): p. 673-84.
60. Maeda, T., M. Takekawa, and H. Saito, *Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor*. Science, 1995. **269**(5223): p. 554-8.
61. Maeda, T., S.M. Wurgler-Murphy, and H. Saito, *A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast*. Nature, 1994. **369**(6477): p. 242-5.
62. Mager, W.H. and J.C. Varela, *Osmostress response of the yeast Saccharomyces*. Mol Microbiol, 1993. **10**(2): p. 253-8.
63. Magliery, T.J., et al., *Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(1): p. 146-57.
64. Mattison, C.P. and I.M. Ota, *Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast*. Genes Dev, 2000. **14**(10): p. 1229-35.
65. Mattison, C.P., et al., *Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(11): p. 7651-60.
66. Michnick, S.W., *Protein fragment complementation strategies for biochemical network mapping*. Curr Opin Biotechnol, 2003. **14**(6): p. 610-7.
67. Michnick, S.W., *Proteomics in living cells*. Drug Discov Today, 2004. **9**(6): p. 262-7.
68. Mumberg, D., R. Muller, and M. Funk, *Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds*. Gene, 1995. **156**(1): p. 119-22.

69. O'Rourke, S.M. and I. Herskowitz, *The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev, 1998. **12**(18): p. 2874-86.
70. O'Rourke, S.M. and I. Herskowitz, *A third osmosensing branch in Saccharomyces cerevisiae requires the Msb2 protein and functions in parallel with the Sho1 branch*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(13): p. 4739-49.
71. O'Rourke, S.M. and I. Herskowitz, *Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(2): p. 532-42.
72. O'Rourke, S.M., I. Herskowitz, and E.K. O'Shea, *Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response*. Trends Genet, 2002. **18**(8): p. 405-12.
73. Ostrander, D.B. and J.A. Gorman, *The extracellular domain of the Saccharomyces cerevisiae Sln1p membrane osmolarity sensor is necessary for kinase activity*. J Bacteriol, 1999. **181**(8): p. 2527-34.
74. Pandey, A. and M. Mann, *Proteomics to study genes and genomes*. Nature, 2000. **405**(6788): p. 837-46.
75. Pascual-Ahuir, A., et al., *Multiple levels of control regulate the yeast cAMP-response element-binding protein repressor Sko1p in response to stress*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37373-8.
76. Pawson, T. and J.D. Scott, *Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins*. Science, 1997. **278**(5346): p. 2075-80.
77. Pelletier, J.N., et al., *An in vivo library-versus-library selection of optimized protein-protein interactions*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(7): p. 683-90.
78. Pelletier, J.N., F.X. Campbell-Valois, and S.W. Michnick, *Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12141-6.
79. Posas, F., et al., *The transcriptional response of yeast to saline stress*. J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17249-55.
80. Posas, F. and H. Saito, *Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK*. Science, 1997. **276**(5319): p. 1702-5.
81. Posas, F. and H. Saito, *Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator*. Embo J, 1998. **17**(5): p. 1385-94.
82. Posas, F., M. Takekawa, and H. Saito, *Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast*. Curr Opin Microbiol, 1998. **1**(2): p. 175-82.
83. Posas, F., E.A. Witten, and H. Saito, *Requirement of STE50 for osmostress-induced activation of the STE11 mitogen-activated protein kinase kinase kinase in the high-osmolarity glycerol response pathway*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(10): p. 5788-96.
84. Posas, F., et al., *Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor*. Cell, 1996. **86**(6): p. 865-75.
85. Prasher, D.C., et al., *Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein*. Gene, 1992. **111**(2): p. 229-33.

86. Proft, M. and R. Serrano, *Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in Saccharomyces cerevisiae: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 537-46.
87. Proft, M. and K. Struhl, *Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress*. Mol Cell, 2002. **9**(6): p. 1307-17.
88. Proft, M. and K. Struhl, *MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction*. Cell, 2004. **118**(3): p. 351-61.
89. Ptashne, M. and A. Gann, *Signal transduction. Imposing specificity on kinases*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1025-7.
90. Raitt, D.C., F. Posas, and H. Saito, *Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway*. Embo J, 2000. **19**(17): p. 4623-31.
91. Reid, B.G. and G.C. Flynn, *Chromophore formation in green fluorescent protein*. Biochemistry, 1997. **36**(22): p. 6786-91.
92. Reiser, V., D.C. Raitt, and H. Saito, *Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure*. J Cell Biol, 2003. **161**(6): p. 1035-40.
93. Reiser, V., H. Ruis, and G. Ammerer, *Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(4): p. 1147-61.
94. Reiser, V., S.M. Salah, and G. Ammerer, *Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmotic stress, the membrane protein Sho1 and Cdc42*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(9): p. 620-7.
95. Remy, I. and S.W. Michnick, *Clonal selection and in vivo quantitation of protein interactions with protein-fragment complementation assays*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(10): p. 5394-9.
96. Remy, I., I.A. Wilson, and S.W. Michnick, *Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change*. Science, 1999. **283**(5404): p. 990-3.
97. Rep, M., et al., *Different signalling pathways contribute to the control of GPD1 gene expression by osmotic stress in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology, 1999. **145** (Pt 3): p. 715-27.
98. Rep, M., et al., *The transcriptional response of Saccharomyces cerevisiae to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8290-300.
99. Rep, M., et al., *Osmotic stress-induced gene expression in Saccharomyces cerevisiae requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(8): p. 5474-85.
100. Reynolds, T.B., et al., *The high osmolarity glycerol response (HOG) MAP kinase pathway controls localization of a yeast golgi glycosyltransferase*. J Cell Biol, 1998. **143**(4): p. 935-46.

101. Rigaut, G., et al., *A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 1030-2.
102. Rubenhagen, R., S. Morbach, and R. Kramer, *The osmoreactive betaine carrier BetP from Corynebacterium glutamicum is a sensor for cytoplasmic K⁺*. Embo J, 2001. **20**(19): p. 5412-20.
103. Ruis, H. and C. Schuller, *Stress signaling in yeast*. Bioessays, 1995. **17**(11): p. 959-65.
104. Saito, H., *Histidine phosphorylation and two-component signaling in eukaryotic cells*. Chem Rev, 2001. **101**(8): p. 2497-509.
105. Sato, N., et al., *Phosphorelay-regulated degradation of the yeast Ssk1p response regulator by the ubiquitin-proteasome system*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(18): p. 6662-71.
106. Schaeffer, H.J. and M.J. Weber, *Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 2435-44.
107. Schuller, C., et al., *The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the Saccharomyces cerevisiae CTT1 gene*. Embo J, 1994. **13**(18): p. 4382-9.
108. Seet, B.T. and T. Pawson, *MAPK signaling: Sho business*. Curr Biol, 2004. **14**(17): p. R708-10.
109. Sheff, M.A. and K.S. Thorn, *Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 2004. **21**(8): p. 661-70.
110. Smits, G.J., et al., *Cell wall dynamics in yeast*. Curr Opin Microbiol, 1999. **2**(4): p. 348-52.
111. Subramaniam, R., et al., *Direct visualization of protein interactions in plant cells*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(8): p. 769-72.
112. Tamas, M.J., et al., *Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation*. Mol Microbiol, 1999. **31**(4): p. 1087-104.
113. Tao, W., R.J. Deschenes, and J.S. Fassler, *Intracellular glycerol levels modulate the activity of Sln1p, a Saccharomyces cerevisiae two-component regulator*. J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 360-7.
114. Teige, M., et al., *Rck2, a member of the calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(10): p. 5625-30.
115. Truong, K. and M. Ikura, *The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(5): p. 573-8.
116. Tsien, R.Y., *Building and breeding molecules to spy on cells and tumors*. FEBS Lett, 2005. **579**(4): p. 927-32.
117. Uesono, Y. and E.A. Toh, *Transient inhibition of translation initiation by osmotic stress*. J Biol Chem, 2002. **277**(16): p. 13848-55.
118. Uetz, P., et al., *A comprehensive analysis of protein-protein interactions in Saccharomyces cerevisiae*. Nature, 2000. **403**(6770): p. 623-7.

119. van Drogen, F. and M. Peter, *MAP kinase cascades: scaffolding signal specificity*. Curr Biol, 2002. **12**(2): p. R53-5.
120. Van Wuytswinkel, O., et al., *Response of Saccharomyces cerevisiae to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway*. Mol Microbiol, 2000. **37**(2): p. 382-97.
121. Verna, J., et al., *A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13804-9.
122. Warmka, J., et al., *Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(1): p. 51-60.
123. Welsh, D.T., *Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate*. FEMS Microbiol Rev, 2000. **24**(3): p. 263-90.
124. West, A.H. and A.M. Stock, *Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(6): p. 369-76.
125. Wood, J.M., *Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999. **63**(1): p. 230-62.
126. Wurgler-Murphy, S.M., et al., *Regulation of the Saccharomyces cerevisiae HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(3): p. 1289-97.
127. Wurgler-Murphy, S.M. and H. Saito, *Two-component signal transducers and MAPK cascades*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(5): p. 172-6.
128. Yale, J. and H.J. Bohnert, *Transcript expression in Saccharomyces cerevisiae at high salinity*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 15996-6007.
129. Yang, F., L.G. Moss, and G.N. Phillips, Jr., *The molecular structure of green fluorescent protein*. Nat Biotechnol, 1996. **14**(10): p. 1246-51.
130. Young, C., et al., *Role of Ptc2 type 2C Ser/Thr phosphatase in yeast high-osmolarity glycerol pathway inactivation*. Eukaryot Cell, 2002. **1**(6): p. 1032-40.
131. Zacharias, D.A., et al., *Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells*. Science, 2002. **296**(5569): p. 913-6.
132. Zarrinpar, A., et al., *Sho1 and Pbs2 act as coscaffolds linking components in the yeast high osmolarity MAP kinase pathway*. Mol Cell, 2004. **14**(6): p. 825-32.
133. Zarrinpar, A., S.H. Park, and W.A. Lim, *Optimization of specificity in a cellular protein interaction network by negative selection*. Nature, 2003. **426**(6967): p. 676-80.
134. Zhan, X.L., R.J. Deschenes, and K.L. Guan, *Differential regulation of FUS3 MAP kinase by tyrosine-specific phosphatases PTP2/PTP3 and dual-specificity phosphatase MSG5 in Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev, 1997. **11**(13): p. 1690-702.